



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

DIPARTIMENTO SCIENZE BIOMEDICHE
PER LA SALUTE

Dottorato di Ricerca in Scienze Morfologiche

XXVII ciclo

**TRANSIZIONE EPITELIO-MESENCHIMALE IN
CELLULE DI CARCINOMA DUTTALE DEL
PANCREAS: STUDIO MORFOLOGICO E
MOLECOLARE**

Coordinatore: Chiar.ma Prof.ssa Chiarella SFORZA

Tutor: Prof.ssa Nicoletta GAGLIANO

Co-Tutor: Prof.ssa Isabella DALLE DONNE

Dott. Marco CLERICI

Matr. n° R09599

INDICE

Indice	2
Introduzione	4
Carcinoma duttale del pancreas	4
Transizione epitelio-mesenchimale	6
Transizione epitelio-mesenchimale e PDAC	10
Complesso E-caderina/ β -catenina	12
E-caderina	12
Regolazione della E-caderina	14
β -catenina	15
Citoscheletro di actina	16
Metalloproteinasi della matrice	20
Classificazione delle MMP	20
Struttura molecolare delle MMP	21
Attivazione delle MMP	22
Regolazione dell'attività delle MMP	24
MMP ed invasività tumorale	26
Marcatori di EMT	26
Colture cellulari 3D: sferoidi	27
Scopo	28
Materiali e metodi	29
Colture cellulari	29
Allestimento di colture cellulari 3D: sferoidi	30
Immunofluorescenza	30
Zimografia	32
Elettroforesi bidimensionale (2DE)	33
Identificazione proteica mediante spettrometria di massa	34
Real-time pcr	35
Western blot	35
Analisi statistica	36

Risultati	37
Caratterizzazione delle tre linee cellulari di PDAC	37
Morfologia cellulare	37
Complesso E-caderina/ β -catenina	37
Citoscheletro actinico	38
Espressione della vimentina	39
Espressione e attività delle MMP	39
Analisi espressione proteica (2DE)	40
Caratterizzazione delle cellule di PDAC in colture 3D	46
Sferoidi di cellule HPAC	46
Analisi dei marcatori di fenotipo epiteliale	47
Analisi dei marcatori di fenotipo mesenchimale	49
Espressione della podoplanina	50
Discussione	51
Caratterizzazione dei marcatori di EMT in cellule di PDAC	51
Effetto dell'organizzazione 3D sul fenotipo di cellule di PDAC	57
Bibliografia	60

INTRODUZIONE

CARCINOMA DUTTALE DEL PANCREAS

L'adenocarcinoma duttale del pancreas (PDAC) è il più comune tumore maligno del pancreas; è uno dei tumori maggiormente aggressivi e rappresenta la quarta causa di morte per cancro nel mondo Occidentale, con una incidenza stimata di più di 40000 casi all'anno negli Stati Uniti (Jemal et al., 2009).

La causa risulta essere complessa e multifattoriale, anche se predominano il fumo di sigaretta (20% dei tumori pancreatici) e la storia familiare (7-10% degli individui affetti). Altri fattori di rischio sembrano essere: pancreatite cronica, età avanzata, sesso maschile, diabete mellito, obesità, gruppi sanguigni non-0, le esposizioni occupazionali (es.: solventi con idrocarburi clorurati e nickel), origine etnica Afro-Americana, una dieta ad alto contenuto di grassi, diete ad alto contenuto di carne e basso di verdure e folati, l'infezione da *Helicobacter pylori*, e le patologie parodontali (Vincent et al., 2011).

Il 65% dei PDAC si localizza a livello della testa del pancreas, il 15% coinvolge il corpo, il 10% la coda, e il 10% è di natura multifocale. I tumori del corpo e della coda sono caratterizzati da una prognosi peggiore (Ghaneh et al., 2007).

Il PDAC evolve a partire da lesioni iniziali non invasive, le quali sono principalmente delle neoplasie intraepiteliali pancreatiche (PanIN), acquisendo durante la sua evoluzione alterazioni genetiche ed epigenetiche clonalmente selezionate. Queste lesioni sono microscopiche (diametro <5 mm) e non sono direttamente visualizzabili tramite l'imaging del pancreas; per tale motivo sono in corso studi per individuare dei markers nel fluido pancreatico che permettano di individuare PanIN ad alto grado. Le PanIN vengono classificate in: PanIN 1 a basso grado e molto comuni con l'aumentare dell'età; PanIN 2; PanIN 3 ad alto grado e presenti nei pancreas con carcinoma invasivo (**Figura 1**).

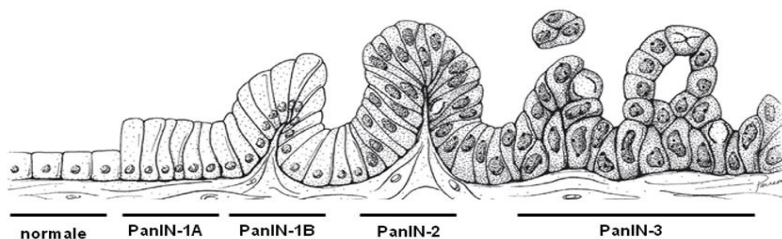


Figura 1. Rappresentazione della progressione del PDAC. L'epitelio duttale normale progredisce fino a diventare carcinoma infiltrante (da sinistra a destra) attraverso una serie di lesioni precancerose definite dal punto di vista istopatologico (PanINs) (modificata da Vincent et al., 2011).

Il carcinoma pancreatico invasivo può evolvere anche da lesioni precancerose meno frequenti come le neoplasie mucinose intraduttali papillari (IPMN): sono delle grosse neoplasie cistiche

(>5 mm) che possono interessare sia il dotto principale, sia i dotti secondari, la cui diagnosi è aumentata grazie ai miglioramenti nell'imaging pancreatico.

Queste lesioni vengono classificate sulla base della quantità di displasia citologica e architetturale come lesioni a basso grado, a grado intermedio, o ad alto grado (carcinoma in situ).

Più raramente le lesioni precancerose possono essere neoplasie cistiche mucinose, le quali sono composte da cellule epiteliali secernenti mucina e da uno stroma simile a quello ovarico. A differenza delle precedenti, queste neoplasie non comunicano con i dotti pancreatici; inoltre, si sviluppano principalmente nelle donne. Circa un terzo di questi precursori si associa ad un carcinoma invasivo.

Dal punto di vista istologico, il PDAC è caratterizzato da una evidente reazione desmoplastica. Per desmoplasia si intende l'accumulo di componenti della matrice extracellulare, di fibroblasti stromali e di cellule stellate (Pandolfi et al., 2009). I componenti della matrice che si accumulano nella reazione desmoplastica sono principalmente i collagene tipo I e V e la fibronectina. Essi sono secreti sia dai fibroblasti associati al tumore, sia dalle cellule stellate del pancreas, che svolgono in questo organo un ruolo simile a quello esercitato dalle cellule stellate epatiche nella patogenesi della fibrosi epatica (Ooi et al., 1997; Kishi et al., 2003). Studi *in vitro* e *in vivo* hanno evidenziato che la peculiare composizione del tessuto fibrotico che si accumula nella reazione desmoplastica gioca un ruolo chiave nel determinare il fenotipo delle cellule tumorali, influenzandone la proliferazione, la capacità di sviluppare giunzioni intercellulari, ed il potenziale invasivo (Fridman et al., 1990).

Le alterazioni genetiche più frequenti nell'adenocarcinoma pancreatico invasivo sono l'attivazione mutazionale dell'oncogene K-Ras, l'inattivazione dei geni oncosoppressori TP53, SMAD4, BRCA2, le amplificazioni geniche e l'accorciamento dei telomeri. Le mutazioni di K-Ras e l'accorciamento dei telomeri sono le alterazioni genetiche più precoci, mentre le inattivazioni di TP53, SMAD4 e BRCA2 avvengono negli stadi avanzati di PanIN e carcinoma invasivo.

Anche le alterazioni nell'espressione dei microRNA sembrano contribuire allo sviluppo e progressione del PDAC (Vincent et al., 2011).

Il PDAC è una patologia eterogenea dal punto di vista molecolare, patologico e clinico. La risposta del paziente al trattamento e l'outcome dipendono da molti fattori, incluso la biologia del tumore, la condizione fisica del paziente e il pattern di progressione della patologia.

Attualmente la terapia per il PDAC consiste nella rimozione chirurgica seguita da chemioterapia e radioterapia adiuvante per gli stadi precoci, e chemioterapia palliativa per gli stadi avanzati (Li et al., 2004). La laparoscopia è un valido approccio per la resezione della coda del pancreas. Il drenaggio biliare pre-operatorio è necessario per i pazienti con colangite, con importanti disfunzioni al fegato e per i pazienti sintomatici (Van der Gaag et al., 2010). A causa dell'elevata aggressività ed invasività del tumore, dopo operazione chirurgica i pazienti sono suscettibili di ricaduta sistemica (70%) e locale (20%).

TRANSIZIONE EPITELIO-MESENCHIMALE

Il termine transizione epitelio-mesenchimale (EMT) definisce una serie di eventi attraverso i quali le cellule epiteliali perdono molte delle loro caratteristiche epiteliali e acquisiscono un fenotipo mesenchimale (Thiery e Sleeman, 2006) (**Figura 2**).

La EMT è un processo dinamico e finemente regolato, ed è un evento fondamentale per gli esseri pluricellulari, in quanto permette la formazione di diversi tessuti e organi. Le prime descrizioni di tale processo, in vitro, risalgono al 1982, e le prime scoperte si riferiscono a studi sullo sviluppo embrionale. Studi successivi hanno evidenziato che la EMT non solo è importante nell'embriogenesi o nell'organogenesi, ma, nell'adulto, anche in molteplici condizioni fisiologiche. Inoltre, la EMT gioca un ruolo chiave anche in alcuni eventi patologici, quali progressione tumorale e fibrogenesi che, pur con esiti molto diversi fra loro, presentano molti steps in comune (Thiery, 2002).

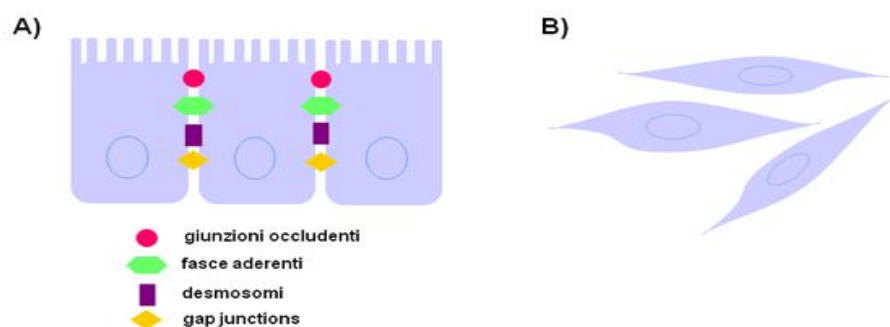


Figura 2. Caratteristiche morfologiche delle cellule epiteliali (A) e mesenchimali (B).

Le cellule epiteliali degli epiteli semplici presentano delle caratteristiche morfo-funzionali ben precise (**Figura 2A**). Si dispongono a formare lamine continue, in cui l'adesività fra le cellule è garantita dalla presenza di diversi dispositivi giunzionali, che conferiscono all'epitelio le proprietà meccaniche. Le cellule epiteliali sono inoltre dotate di polarità e, pertanto, si riconoscono differenti specializzazioni a livello delle loro porzioni apicale, laterale e basale,

che si riflettono in una polarità di organizzazione citoplasmatica ultrastrutturale e funzionale. Le cellule epiteliali sono scarsamente mobili: i movimenti sono consentiti solo all'interno dell'epitelio di cui esse fanno parte.

Le cellule mesenchimali (**Figura 2B**) non sono dotate né di polarità morfologica, né funzionale. Non si organizzano a formare strutture laminari e fra di loro non si instaurano dispositivi giunzionali stabili, ma solo localizzati punti di adesione focale. Le cellule mesenchimali hanno una forma fusata o stellata, e sono dotate di elevata mobilità ([Thiery e Sleeman, 2006](#)), che ne permette la migrazione nell'interstizio circostante mediante diversi meccanismi basati sull'emissione di filopodi e pseudopodi ([Friedl, 2004](#)).

Durante la EMT le cellule epiteliali perdono il loro fenotipo epiteliale per acquisire quello di cellule mesenchimali. Durante questo processo, esse si riorganizzano perdendo alcuni marcatori del loro fenotipo epiteliale, mentre ne esprimono altri caratteristici del fenotipo mesenchimale acquisito. Si verifica pertanto una "riprogrammazione" molecolare dell'epitelio, con nuove istruzioni per la cellula. Si può parlare, quindi, di "proteoma della EMT".

Il marcatore chiave della EMT è la down-regolazione della E-caderina. Infatti, la perdita delle giunzioni aderenti, e del conseguente rapporto col citoscheletro, sembra essere l'evento che favorisce la realizzazione dell'intero processo. La diminuzione della E-caderina inizia precocemente. Vengono down-regolate anche le proteine delle tight junctions, come la ZO1 che, in particolare, interagisce con diverse proteine transmembrana (come l'occludina) e con componenti delle giunzioni aderenti e gap.

FSP1 (Ca^{2+} - binding protein fibroblast specific protein 1) è una proteina legante il calcio specifica dei fibroblasti. Recentemente è stata però messa in dubbio la sua specificità quale marcatore specifico di EMT. L'actina muscolare di muscolo liscio (αSMA) è un tipico marker di EMT. Bisogna tuttavia tener presente che è espressa nei miofibroblasti (cioè i fibroblasti attivati), benchè a volte non in tutti, e non nei fibroblasti.

Le metalloproteinasi della matrice 2 e 9 (MMP-2 e 9), chiamate anche gelatinasi, sono importanti marcatori di EMT. Esse sono prodotte dai fibroblasti e risultano up-regolate, favorendo la degradazione delle membrane basali.

La vimentina, una proteina citoscheletrica dei filamenti intermedi, viene utilizzata come marcatore di cellula mesenchimale. La sua espressione *de novo* si correla con la down-regolazione delle citocheratine epiteliali. Essa non è però un marcatore specifico, in quanto espressa anche in cellule di tipo diverso come, ad esempio, leucociti e cellule endoteliali, ed in alcuni carcinomi in cui non vi è evidenza di EMT ([Zavadil e Bottinger, 2005](#)).

La EMT si può verificare in tre condizioni biologiche distinte con esiti funzionali differenti fra loro; è stata pertanto proposta una classificazione della EMT in tre diversi sottotipi a seconda

del contesto biologico in cui essa si verifica, che prendono il nome di EMT di “Tipo 1”, “Tipo 2”, “Tipo 3” (Kalluri e Weinberg, 2009) (Figura 3).

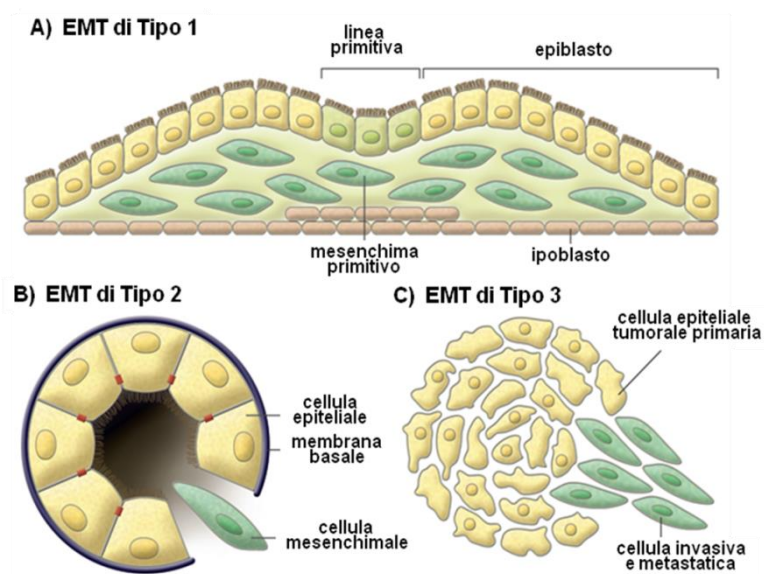


Figura 3. Rappresentazione della classificazione dei sottotipi di EMT: Tipo 1 (A), Tipo 2 (B), Tipo 3 (C) (modificata da Kalluri et al., 2009).

EMT di Tipo 1: nei primissimi stadi dell'embrigenesi, l'impianto dell'embrione e l'inizio della formazione della placenta sono entrambi associati ad una EMT che coinvolge l'endoderma. In particolare, le cellule del trofoblasto, precursori del citotrofoblasto, vanno incontro a EMT per facilitare l'invasione dell'endometrio e il conseguente corretto impianto dell'embrione. Durante lo sviluppo embrionale anche la fase di gastrulazione è interessata dal processo di EMT, attraverso il quale si arriva alla formazione dei tre foglietti embrionali (Vicovac e Aplin, 1996), e le cellule epiteliali del neuroectoderma danno origine, sempre tramite EMT, a cellule migratorie della cresta neurale.

EMT di Tipo 2: questo tipo di EMT è associato alla fibrosi d'organo, processo che interessa alcuni tessuti epiteliali ed è mediato da cellule infiammatorie e fibroblasti che rilasciano una certa quantità di segnali pro-infiammatori, così come componenti della matrice extracellulare come collagene, laminina, elastina, fibronectina e tenascina.

Gli organi interessati dalla EMT di Tipo 2 e dal processo di fibrogenesi sono soprattutto il rene, il fegato, i polmoni e l'intestino, spesso in associazione ad una condizione di infiammazione cronica (Potenta et al., 2008).

Durante la EMT di Tipo 2, le cellule epiteliali degli organi interessati continuano a mantenere una morfologia epiteliale e l'espressione di marcatori molecolari come citocheratine e E-caderina, esprimendo allo stesso tempo il marcatore mesenchimale FSP1 (proteina specifica

dei fibroblasti) e α -SMA (l'isoforma α dell'actina di muscolo liscio). Si trovano quindi in uno stadio intermedio definito "EMT parziale" (Kalluri e Weinberg, 2009).

La condizione infiammatoria può richiamare cellule come macrofagi e fibroblasti residenti attivati, che si accumulano nel sito danneggiato e rilasciano fattori di crescita, come TGF- β , PDGF, EGF e FGF, che stimolano l'EMT. Queste cellule rilasciano anche chemochine e metalloproteinasi della matrice (MMPs). Sotto l'influenza di queste molecole segnale le cellule epiteliali, insieme alle cellule infiammatorie, inducono la degradazione del collagene di tipo IV e della laminina della membrana basale, favorendo la migrazione delle cellule trasformate nell'interstizio circostante dove contribuiscono al fenomeno fibrotico (Strutz et al., 2002).

EMT di Tipo 3: questo tipo di EMT è associato alla progressione dei carcinomi e alla metastatizzazione. Durante la progressione tumorale, le cellule di carcinoma, soprattutto quelle presenti al fronte invasivo del tumore primario, mostrano frequentemente una down-regolazione dei marcatori del fenotipo epiteliale e una perdita delle giunzioni intercellulari, risultando nella perdita di polarità tipica delle cellule epiteliali e in una ridotta adesività intercellulare. Tutto ciò è spesso accompagnato da un'aumentata motilità cellulare e dall'espressione di marcatori mesenchimali come la vimentina, una proteina dei filamenti intermedi, e la N-caderina (Lang et al., 2002; Thiery, 2003). Vengono up-regolate anche altre proteine citoscheletriche, come l'isoforma α dell'actina di muscolo liscio (α SMA), la γ -actina, la β -filamina e la talina, così come altre componenti della ME come la fibronectina ed il collagene (Lagamba et al., 2005). L'up-regolazione di queste proteine può facilitare la formazione di pseudopodi e il rimodellamento del citoscheletro. Vengono, infine, up-regolate anche le MMPs, che permettono alle cellule tumorali di invadere il microambiente circostante e di dar luogo a metastasi a distanza. La EMT si configura, quindi, come un prerequisito per originare cellule tumorali capaci di infiltrare i tessuti circostanti e di metastatizzare (Figura 4).

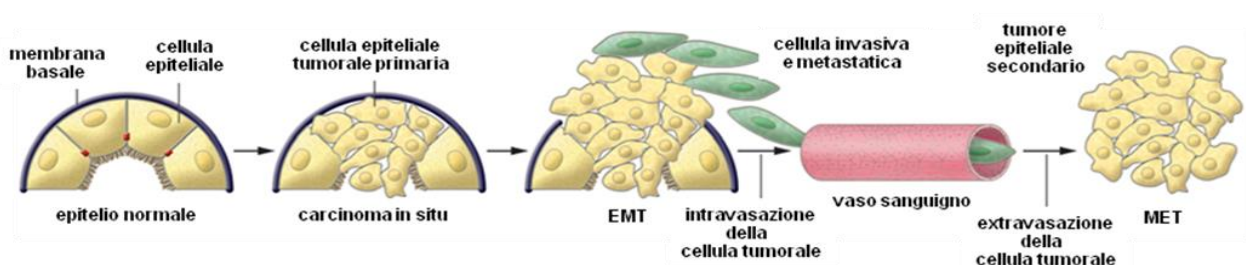


Figura 4. Figura rappresentativa delle fasi della EMT nella progressione tumorale (da Kalluri, 2009).

I tumori sono tuttavia costituiti da una popolazione cellulare altamente eterogenea e, in alcuni casi, molti carcinomi invasivi e metastatici non sono caratterizzati da una completa transizione ad un fenotipo mesenchimale, ma bensì possiedono le caratteristiche molecolari e morfologiche tipiche di un epitelio ben differenziato, esprimendo alti livelli di E-caderina e presentando giunzioni epiteliali e polarità apicale-basolaterale ([Christiansen e Rajasekaran, 2006](#)). Questo può essere dovuto al fatto che le cellule di carcinoma maligno possono iniziare una parziale EMT e ritornare da mesenchimali a epiteliali nei siti di metastasi distali secondo un processo detto MET (transizione mesenchimale-epiteliale); infatti, questi tumori secondari nei siti distali mantengono le stesse caratteristiche istopatologiche del tumore primario, senza mostrare fenotipo mesenchimale ([Kalluri e Weinberg, 2009](#)).

Un'altra spiegazione compatibile con il mantenimento di un fenotipo epiteliale differenziato e l'elevata invasività delle cellule di carcinoma può risiedere nelle diverse modalità di infiltrazione e metastasi, quali ad esempio la migrazione collettiva, mediante la quale alcuni carcinomi invasivi invadono i tessuti circostanti sotto forma di aggregati multicellulari o clusters. In quest'ultimo caso, le cellule localizzate all'interno dell'aggregato vengono protette dall'ambiente esterno e quindi anche dagli attacchi immunologici. Inoltre, le giunzioni epiteliali nei carcinomi metastatici ben differenziati possono formare una barriera fisica che restringe l'accesso di farmaci o anticorpi al sito tumorale, diminuendo quindi l'efficacia terapeutica ([Christiansen e Rajasekaran, 2006](#)). Queste evidenze mostrano che la transizione ad un fenotipo maligno aggressivo non è un evento "tutto o nulla" ([Christiansen e Rajasekaran, 2006](#)).

TRANSIZIONE EPITELIO-MESENCHIMALE E PDAC

Studi in modelli sperimentali animali hanno dimostrato il ruolo del processo di EMT nella progressione del PDAC, favorendo la disseminazione di metastasi a distanza e la resistenza al trattamento terapeutico ([Cano et al., 2010](#); [Krantz et al., 2010](#)).

Nel carcinoma pancreatico il maggior induttore di EMT sembra essere TGF- β . L'espressione del TGF- β 1 è stata evidenziata con metodi immunoistochimici nel 41.4% dei pazienti e alti livelli di questo fattore nel siero si associano ad una prognosi infausta ([Friess et al., 1993](#)). Analisi clinico-patologiche mostrano che l'espressione di TGF- β 1 è significativamente correlata con le metastasi linfonodali ([Cano et al., 2010](#)).

I pathways molecolari che supportano gli effetti pro-tumoral del TGF- β 1 nel PDAC sono stati documentati da esperimenti in vitro effettuati su linee cellulari umane di carcinoma pancreatico. In particolare, gli esperimenti sulla linea cellulare Panc-1 dimostrano il

coinvolgimento dei pathways di trasduzione Ras-dipendenti nell'induzione di EMT da parte del TGF- β (Cano et al., 2010).

Mutazioni attivanti di K-Ras sono presenti in tutti i carcinomi pancreatici umani e queste sembrano essere responsabili delle fasi precoci dello sviluppo del tumore. I pathways di Ras/ERK1/2 sono coinvolti nella trasformazione delle cellule cancerose in mesenchimali ed esiste una correlazione positiva tra EMT e l'attivazione di ERK in queste cellule, con una bassa sopravvivenza dei pazienti (Cano et al., 2010).

Altri studi sulla linea cellulare Panc-1 hanno dimostrato una down-regolazione del recettore di tipo III di TGF- β (T β RIII) durante la EMT ed hanno evidenziato che tale evento è necessario per aumentare la motilità cellulare e l'invasività di queste cellule in seguito a EMT indotta da TGF- β . Inoltre, nel carcinoma pancreatico umano l'espressione di T β RIII è inversamente correlata al grado di malignità (Gordon et al., 2008).

Le cellule altamente metastatiche mostrano un basso livello di espressione della E-caderina. Nel PDAC questo sembra essere dovuto alla collaborazione tra l'istone deacetilasi (HDAC) e il complesso del repressore trascrizionale Snail, che portano alla diminuzione dell'espressione del gene della E-caderina (Cano et al., 2010). Altri fattori importanti per la stimolazione della EMT nel PDAC sono HGF, BMPs e VEGF. Sia HGF sia il suo recettore c-Met sono over-espressi nel PDAC ed il trattamento della linea cellulare Colo-357 con HGF promuove l'invasività cellulare.

RON è un recettore tirosin chinasi correlato con c-Met. Esso risulta over-espresso nel 93% dei PDAC umani e la sua espressione è stata rilevata in tutte le linee cellulari di PDAC umano testate. La sua stimolazione si correla alla diminuzione dell'espressione di E-caderina e alla traslocazione nucleare di β -catenina, promuovendo quindi l'invasività (Cano et al., 2010).

Uno studio recente ha evidenziato alcuni dei meccanismi che, durante la EMT, portano alla down-regolazione della E-caderina in cellule di PDAC (Hotz et al., 2007). In particolare, l'espressione di alcuni regolatori della EMT, quali Slug e Snail, è stata correlata al grado di differenziazione della cellula tumorale, ai livelli di espressione della E-caderina ed alla localizzazione. I risultati di questo studio hanno dimostrato che Slug e Snail sono maggiormente espressi nei tessuti affetti da PDAC rispetto ai tessuti pancreatici normali e hanno suggerito che Snail sia il principale repressore della E-caderina nel PDAC e che agisca nelle fasi precoci del processo invasivo.

Le BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) giocano un ruolo importante nelle cellule di carcinoma pancreatico. In Panc-1 è stato infatti evidenziato che i membri di questa famiglia inducono EMT in quanto stimolano la perdita di E-caderina e l'acquisizione di capacità migratorie e invasività, grazie soprattutto all'aumentata espressione e attività della MMP-2.

Inoltre, BMP riduce l'espressione di T β RIII durante la progressione tumorale (Cano et al., 2010).

VEGF- α e VEGF- β , attraverso interazione con il loro recettore VEGFR1, inducono migrazione cellulare, invasione e EMT delle cellule di carcinoma pancreatico. Infatti, il clustering di VEGFR1 stimola il riarrangiamento della E-caderina e della β -catenina, nonché la loro traslocazione dalla membrana cellulare al citoplasma e al nucleo, rispettivamente. L'attivazione di VEGFR1 porta, inoltre, alla down-regolazione dell'espressione di E-caderina e placoglobina ed alla up-regolazione delle proteine citoscheletriche mesenchimali vimentina e N-caderina; si associa anche all'aumentata espressione dei repressori Snail, Twist e Slug (Cano et al., 2010).

Un'altra componente importante nel controllo della EMT sono i microRNAs: essi sono una classe di corti RNA non codificanti implicati nella regolazione post-trascrizionale dell'espressione genica. Alcuni studi hanno dimostrato che la EMT è associata alla down-regolazione di cinque membri della famiglia dei miRNA, suggerendo quindi un ruolo di regolazione negativa della EMT da parte di questi miRNA. Uno studio sulle cellule Panc-1 ha mostrato che nelle cellule di carcinoma pancreatico la down-regolazione dei membri della famiglia dei miR-200 (miR-141 e miR-200c) è guidata dal repressore trascrizionale ZEB1 durante EMT (Burk et al., 2008). ZEB1 e TGF- β sono tra i geni target della famiglia dei miR-200 e questo evidenzia un reciproco feedback di regolazione negativa.

La regolazione del profilo dei miRNA mediata dalla EMT è associata alla resistenza alla chemioterapia da parte delle cellule di PDAC; si è vista, infatti, una down-regolazione dei membri della famiglia dei miR-200 nelle cellule resistenti alla gemcitabina (Cano et al., 2010).

L'adesione cellulare ai componenti della matrice extracellulare è un importante aspetto del fenotipo mesenchimale e quindi della EMT. Essa gioca un ruolo fondamentale nel PDAC, data la presenza di un microambiente caratterizzato da una accentuata reazione desmoplastica associata a questo tipo di tumore. L'adesione al collagene promuove la EMT delle cellule di PDAC inducendo l'espressione della N-caderina, caratteristica del fenotipo mesenchimale (Cano et al., 2010).

COMPLESSO E-CADERINA/ β -CATENINA

E-caderina

Negli epiteli le giunzioni aderenti possono percorrere l'intero perimetro della cellula con una disposizione "a cintura", prendendo il nome di zonula o fascia aderente, o distribuirsi a "moneta" in punti di piccola estensione, prendendo il nome di macula aderente o desmosoma (Figura 5). Le giunzioni aderenti consentono il mantenimento dell'adesività intercellulare

grazie alla presenza di glicoproteine transmembrana, chiamate caderine, che permettono l'ancoraggio di due cellule contigue. Questa famiglia di proteine è composta da diversi membri denominati, sulla base della loro espressione tissutale, E-caderine (epiteliali), M-caderine (muscolari), P-caderine (placentari), VE-caderine (dell'endotelio vascolare), N-caderine (neuronal).

La E-caderina è la principale glicoproteina delle fasce aderenti, costituita da un unico dominio transmembrana. Dal punto di vista strutturale è composta da cinque domini extracellulari ripetuti e da due domini citoplasmatici conservati, che sono il dominio di legame per le catenine (CBD) e il dominio iuxtamembrana (JMD).

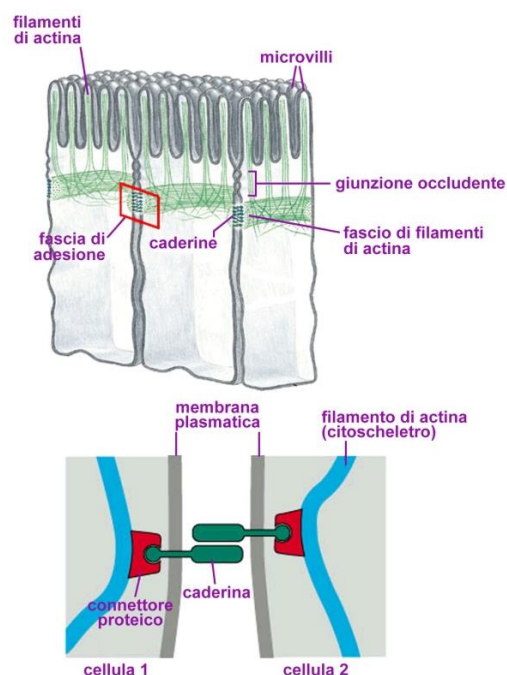


Figura 5. Rappresentazione della disposizione delle giunzioni presenti fra cellule epiteliali e dei principali componenti delle zonule aderenti.

I domini extracellulari delle E-caderine di cellule adiacenti interagiscono fra loro, attraverso un legame Ca^{2+} -dipendente, permettendo una debole adesione cellula-cellula e la formazione delle fasce aderenti (Halbleib e Nelson, 2006; Hartsock e Nelson, 2008). Il dominio intracellulare della E-caderina, invece, prende rapporto coi filamenti di actina del citoscheletro mediante interposizione di altre proteine appartenenti alla famiglia delle catenine: p120-catenina (lega lo JMD), β -catenina (lega la coda C-terminale), e α -catenina (Christiansen e Rajasekaran, 2006; Hartsock e Nelson, 2008) (Figura 6).

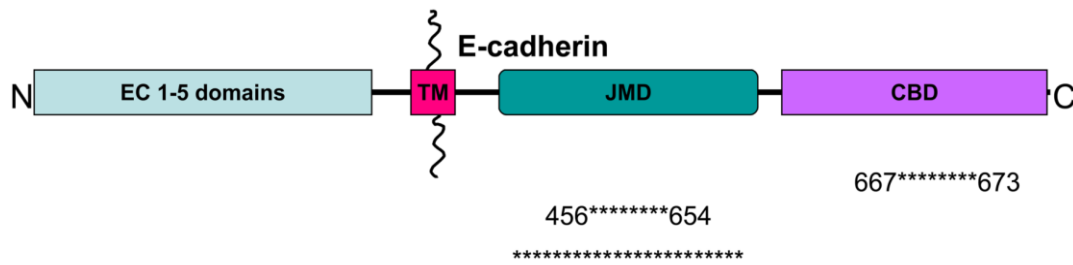


Figura 6. Rappresentazione della struttura molecolare della E-caderina (da [Hartsock et al., 2008](#)).

In seguito alla formazione dei contatti intercellulari, le caderine clusterizzano e rinforzano il legame. Questa adesione è altamente dinamica e permette la riorganizzazione delle cellule, ad esempio durante la EMT. La down-regolazione della E-caderina è infatti uno degli eventi chiave che caratterizzano la EMT ed è generalmente considerato un indicatore clinico di cattiva prognosi e metastasi.

Le fasce o zonule aderenti rivestono un ruolo chiave durante il processo di EMT, che induce importanti modificazioni a carico della E-caderina. Studi in letteratura hanno dimostrato che la E-caderina è un importante determinante del fenotipo epiteliale. Essa viene down-regolata durante la EMT, e in vivo è stata dimostrata una correlazione fra la sua down-regolazione e la perdita del fenotipo epiteliale ([Wheelock e Johnson, 2003](#)). La perdita di E-caderina è un evento necessario, anche se non sufficiente, perché si verifichi la EMT. L'importanza della perdita di E-caderina è stata ulteriormente confermata dalla dimostrazione che la sua produzione de novo in cellule in corso di EMT, ripristina stabili contatti cellula-cellula ed il fenotipo epiteliale, promuovendo quindi la formazione dei desmosomi e la formazione di complessi giunzionali stabili ([Vleminckx et al., 1991](#)).

I meccanismi molecolari alla base della down-regolazione della E-caderina non sono completamente noti, ma si ipotizza che possa avvenire mediante una regolazione epigenetica o mutazione occasionale. Nel primo caso si verificano una ipermetilazione del promotore ed il legame ad esso di repressori; nel secondo caso si verifica la produzione di una proteina non funzionante, o la sua non produzione ([Peinado et al., 2004](#); [Huber et al., 2005](#)).

Regolazione della E-caderina

L'integrità strutturale del complesso caderina-catenina è regolata dalle chinasi, le quali risultano spesso up-regolate durante lo sviluppo e nella carcinogenesi. Tre residui di serina nel dominio citoplasmatico della E-caderina vengono fosforilati dalla chinasi GSK3 β (glicogeno sintasi chinasi β) causando un aumento dell'affinità e del numero di interazioni con la β -catenina. Se invece la fosforilazione avviene sui residui di tirosina della β -catenina, ad opera

della Src, si ha la rottura del legame con la caderina. L'attività di queste chinasi è bilanciata da quella delle fosfatasi (Nelson, 2008).

Anche il legame della p120-catenina alla regione iuxtamembrana del dominio citoplasmatico della E-caderina è regolato dalla fosforilazione, la quale aumenta l'affinità di legame alla E-caderina stessa. La p120-catenina aumenta la ritenzione del complesso della caderina alla membrana plasmatica e previene l'internalizzazione e la degradazione della caderina (Hartsock e Nelson, 2008). La perdita di questa stabilità è correlata alla progressione e all'invasione tumorale.

La E-caderina può essere regolata sia a livello trascrizionale, sia a livello post-traduzionale. La repressione trascrizionale è mediata da una serie di fattori di trascrizione come Snail, Slug, ZEB1, ZEB2 e Twist. L'attivazione di questi repressori può portare a silenziamento epigenetico, ad esempio attraverso il richiamo di HDAC (istone deacetilasi) al promotore della E-caderina, che induce deacetilazione. Inoltre, in una grande varietà di tumori umani il gene della E-caderina è altamente ipermetilato (Yilmaz e Christofori, 2009). In entrambe le situazioni ciò che ne risulta è una down-regolazione della E-caderina.

A livello post-traduzionale, il trasporto della E-caderina di nuova sintesi alla membrana cellulare può essere inibito attraverso la O-glicosilazione. In alternativa, la E-caderina può essere degradata da taglio proteolitico o endocitata. Attraverso taglio proteolitico possono prodursi frammenti della E-caderina che esercitano funzioni di segnalazione. Ad esempio, il taglio mediato dalla γ -secretasi produce un frammento citoplasmatico C-terminale (CTF2) che viene trasportato nel nucleo in maniera p120-catenina-dipendente. Nel nucleo, CTF2 modula l'interazione tra p120-catenina e un repressore trascrizionale (Kaiso), modificando ad esempio la sopravvivenza cellulare (Ferber et al., 2008; Yilmaz e Christofori, 2009). Altri frammenti noti derivanti da digestione proteolitica della E-caderina sono CTF1 e CTF3. Il primo deriva dall'attività proteolitica delle MMPs a livello dell'interfaccia tra le regioni intra- ed extracellulari della proteina, mentre il secondo rappresenta il frammento C-terminale di minor peso molecolare che si forma, ad esempio, per azione della caspasi-3 (Ferber et al., 2008).

Un possibile meccanismo di degradazione della caderina richiede, in seguito alla fosforilazione mediata da Src, l'azione di una E3-ubiquitina ligasi, detta Hakai, la quale lega la E-caderina provocandone l'internalizzazione (Hartsock e Nelson, 2008; Nelson, 2008). L'endocitosi può avvenire attraverso meccanismi clatrina o caveolina-dipendenti.

β -catenina

La β -catenina è una proteina citoplasmatica costituita da 13 ripetizioni di un caratteristico dominio "armadillo" che formano una tripla α elica. Essa lega il dominio citoplasmatico C-

terminale della E-caderina (**Figura 7**). L'affinità di questa interazione con la E-caderina è molto alta e non sono ancora note evidenze della dissociazione della catenina dalla caderina, ad esempio durante l'internalizzazione di quest'ultima. La β -catenina, a sua volta, lega a bassa affinità l' α -catenina, la quale permette l'interazione con il citoscheletro interagendo, oltre che con l'actina, con alcune proteine leganti l'actina come la vinculina e l' α -actinina (Yamada et al., 2005; Hartsock e Nelson, 2008).

La β -catenina citosolica può legarsi al fattore di trascrizione Tcf/Lef in seguito ad attivazione da parte di Wnt e mediare la trascrizione di geni coinvolti nella proliferazione cellulare, migrazione e invasione. Un altro target recentemente scoperto è la fascina, una proteina legante l'actina che è essenziale per la formazione dei filopodi e per la motilità e l'invasività delle cellule neoplastiche (Nelson e Nusse, 2004; Yilmaz e Christofori, 2009). Normalmente i livelli citosolici di β -catenina sono bassi in quanto l'eccesso viene rapidamente mandato al proteasoma per la degradazione.

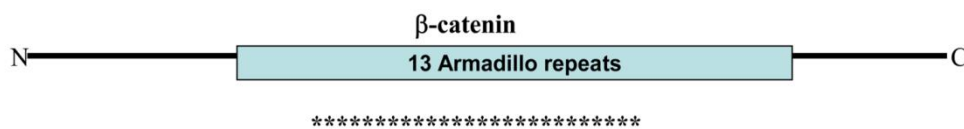


Figura 7. Rappresentazione della struttura molecolare della β -catenina (da Hartsock et al., 2008).

Quando, durante la EMT, si verificano la down-regolazione della E-caderina e la disgregazione della zonula aderente, la β -catenina viene liberata dal complesso E-caderina/ β -catenina e rilasciata nel citoplasma. Essa può traslocare nel nucleo e influenzare i processi di trascrizione, come precedentemente descritto.

CITOSCHELETRO DI ACTINA

I filamenti di actina del citoscheletro sono altamente dinamici e giocano un ruolo importante nel regolare la dinamicità della membrana plasmatica, la migrazione cellulare e la forma della cellula (Pollard e Borisy, 2003; Yilmaz e Christofori, 2009). I microfilamenti di actina (la componente più sottile del citoscheletro) si formano per polimerizzazione di unità monomeriche di actina globulare (G-actina), una proteina che lega l'ATP. Dopo l'accrescimento del filamento l'ATP viene idrolizzato in ADP. I microfilamenti sono caratterizzati da una polarità strutturale in quanto presentano un'estremità "più" chiamata "barbed end", dove avviene preferenzialmente la polimerizzazione con aggiunta di ATP-G-

actina, ed un'estremità "meno" chiamata "pointed end", in cui prevalgono i fenomeni di depolimerizzazione del filamento.

Nelle cellule epiteliali i microfilamenti si dispongono tipicamente in fasci corticali subito al di sotto della membrana cellulare e nella parte apicale del citoplasma si organizzano a costituire il "terminal web" (**Figura 8**).

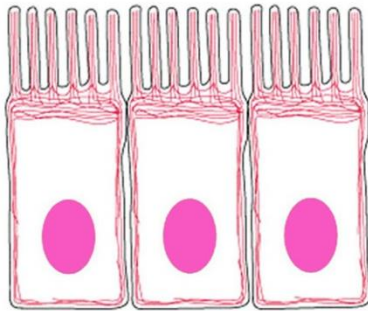


Figura 8. Disegno rappresentativo del pattern di distribuzione dei microfilamenti in cellule epiteliali. I filamenti di actina (in rosso) si dispongono a formare i fasci corticali subito al di sotto della membrana plasmatica e, nel caso siano presenti microvilli, si portano a formare l'asse di tali specializzazioni apicali.

L'actina gioca un ruolo chiave non solo nel fornire un'impalcatura che favorisce il mantenimento della forma della cellula, ma anche nei meccanismi di motilità cellulare, in quanto rappresenta il componente principale di dispositivi che le cellule usano per migrare su di un substrato. Tali dispositivi sono i filopodi, i lamellipodi, i pseudopodi (**Figura 9**). Filamenti di actina sono presenti anche negli invadopodi.

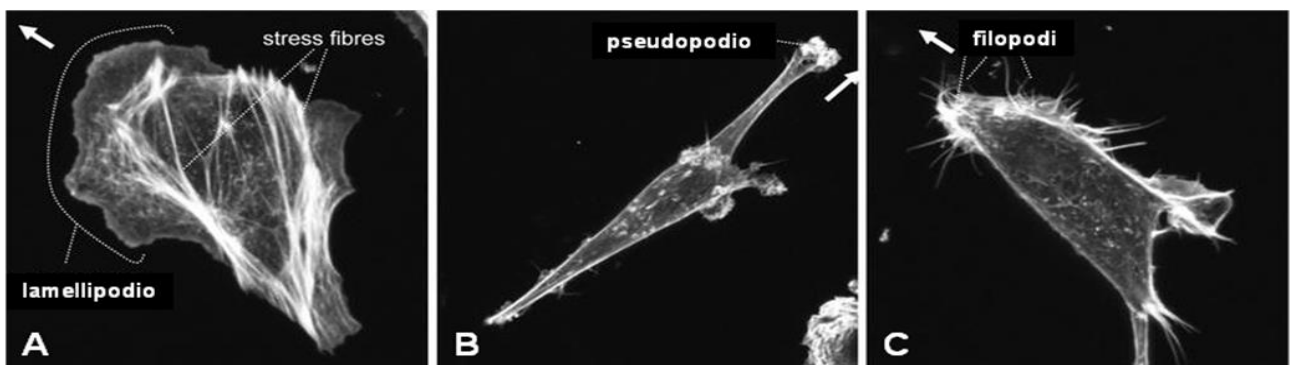


Figura 9. Microfotografie che mostrano la diversa organizzazione dei filamenti di actina in tre diverse cellule tumorali che si muovono su un substrato. Le immagini mostrano sul fronte di migrazione della cellula la presenza di un lamellipodio (A), di uno pseudopodio (B), e di filopodi (C) ([modificata da Olson e Sahai, 2009](#)).

Queste strutture sono coinvolte nella formazione delle adesioni focali, le quali costituiscono il sistema di interazione cellula-matrice, che permette alla cellula di esercitare una trazione sul suo substrato e quindi di produrre la forza necessaria per il movimento.

Le adesioni focali sfruttano la presenza delle integrine, proteine di adesione transmembrana che ancorano da una parte la matrice extracellulare e dal lato citoplasmatico il citoscheletro di actina, il quale si organizza a formare le stress fibers, costituite da filamenti contrattili di actina e miosina II, a cui si legano varie proteine, tra cui l' α -actinina. La loro formazione viene stimolata da RhoA, che attiva ROCK che, a sua volta, fosforila la catena leggera della miosina favorendone l'associazione ai filamenti di actina. I membri della famiglia delle Rho GTPasi, RhoA, Rac1 e Cdc42, sono responsabili della trasmissione del segnale per il movimento cellulare e svolgono un ruolo importante anche nella EMT. La loro attivazione è posta sotto il controllo di tre gruppi di proteine regolatrici: guanine nucleotide exchange factors (GEF), GTPase-activating proteins (GAP) e guanine nucleotide dissociation inhibitors (GDI). In particolare, le Rho GTPasi sono attivate dalle GEF e inattivate dalle GAP; le GDI legano Rho-GDP inattivo e prevengono l'interazione con le GEF e quindi l'attivazione (Yilmaz e Christofori, 2009).

I **lamellipodi** sono delle protrusioni piatte nelle quali alla base si localizzano lunghi filamenti di actina non ramificata, arricchiti in tropomiosina e miosina II, che proseguono in un network di actina altamente ramificata procedendo in direzione della base dei filopodi (Yilmaz e Christofori, 2009).

I filamenti di actina polimerizzano dal lato del fronte di avanzamento e depolimerizzano sul lato opposto secondo un processo conosciuto come "treadmilling", nel quale intervengono diverse proteine leganti l'actina (Le Clainche e Carlier, 2008):

- la cofilina, che lega l'estremità del filamento legato all'ADP, favorendone la depolimerizzazione;
- la profilina, che lega l'actina monomerica e contribuisce ad aumentare il rate di treadmilling;
- le proteine capping, che legano con alta affinità le barbed ends dei filamenti di actina.

La ramificazione laterale è principalmente controllata dal complesso Arp2/3, composto da sette subunità conservate, la cui attività è a sua volta controllata da fattori come i complessi WASP o WAVE richiamati in membrana e attivati da Rac1 e dalla proteina legante l'actina, la cortactina (Le Clainche e Carlier, 2008; Yilmaz e Christofori, 2009). Nel fronte di avanzamento del lamellipodio, la cellula forma delle adesioni che connettono la matrice extracellulare al citoscheletro di actina per ancorare la protrusione (Le Clainche e Carlier, 2008).

L'aumentata espressione di Arp2/3 e WAVE2 è correlata nel cancro al seno e al fegato con una prognosi infausta, sottolineando l'importanza di strutture come i lamellipodi nella progressione tumorale (Yilmaz e Christofori, 2009).

I **filopodi** sono delle estensioni digitiformi formate da fasci di actina non ramificati strettamente impacchettati, che penetrano nell'ambiente circostante originando dalla base del lamellipodio, la cui formazione è controllata dalla fascina e dalla Rho-GTPasi Cdc42. I filopodi possono essere considerati come organi di senso della cellula che vengono utilizzati per rilevare segnali come molecole chemoattraenti.

Le cellule metastatiche sono ricche di strutture simili ai filopodi e ciò correla con la loro invasività. L'up-regolazione della fascina correla con una cattiva prognosi in diversi tipi di carcinoma, incluso il gastrico, quello ai polmoni e quello al seno (Yilmaz e Christofori, 2009).

Dopo aver creato adesioni tramite lamellipodi e filopodi, per muoversi in avanti la cellula ritrae il "trailing edge" grazie al sistema acto-miosinico e al disassemblaggio delle adesioni al substrato (Le Clainche e Carlier, 2008).

Le due strutture cellulari maggiormente specializzate per l'invasione sono i podosomi e gli invadopodi.

I **podosomi** sono presenti nei macrofagi e nelle cellule endoteliali. Sono strutture altamente dinamiche, puntiformi, ricche in actina e presenti all'interfaccia tra la cellula e il substrato, che si formano nelle fasi iniziali dell'adesione al substrato. I podosomi sono composti da un core centrale formato da fasci di filamenti di actina posizionati perpendicolarmente rispetto alla membrana, fiancheggiato da un anello contenente proteine di adesione connesso al core da filamenti di actina disposti radialmente (Vignjevic e Montagnac, 2008).

Gli **invadopodi** sono protrusioni digitiformi che si formano sulla superficie ventrale della cellula e che si estendono in profondità nella ME grazie alla loro attività proteolitica (Vignjevic e Montagnac, 2008) (**Figura 10**). Dati in letteratura hanno suggerito che possano svolgere un ruolo fondamentale nell'invasione delle cellule tumorali e si formano durante l'EMT. Sono considerati la controparte trasformata dei podosomi: infatti, entrambi sono caratterizzati da un core ricco in filamenti di actina contenente il macchinario di assemblaggio dell'actina (WASP, cortactina e Arp2/3). Gli invadopodi mediano la proteolisi della ME nelle cellule tumorali invasive tramite l'espressione delle MMPs, soprattutto MT1-MMP e MMP-2 (Yilmaz e Christofori, 2009). La loro formazione, che può essere stimolata da diversi segnali come EGF, HGF, TGF- β , segue diversi steps (Yilmaz e Christofori, 2009):

- un locale arricchimento in actina e cortactina nei siti di contatto tra cellula e matrice richiama la MT1-MMP. Questo step è chiamato pre-invadopodi;
- in seguito si ha ulteriore arricchimento in actina, cortactina e MT1-MMP, che porta alla degradazione della matrice e alla formazione di invadopodi maturi e invasivi;
- gli invadopodi tardivi sono caratterizzati dalla dispersione dell'actina e cortactina, lasciando una struttura ricca di MT1-MMP che mantiene la degradazione della matrice.

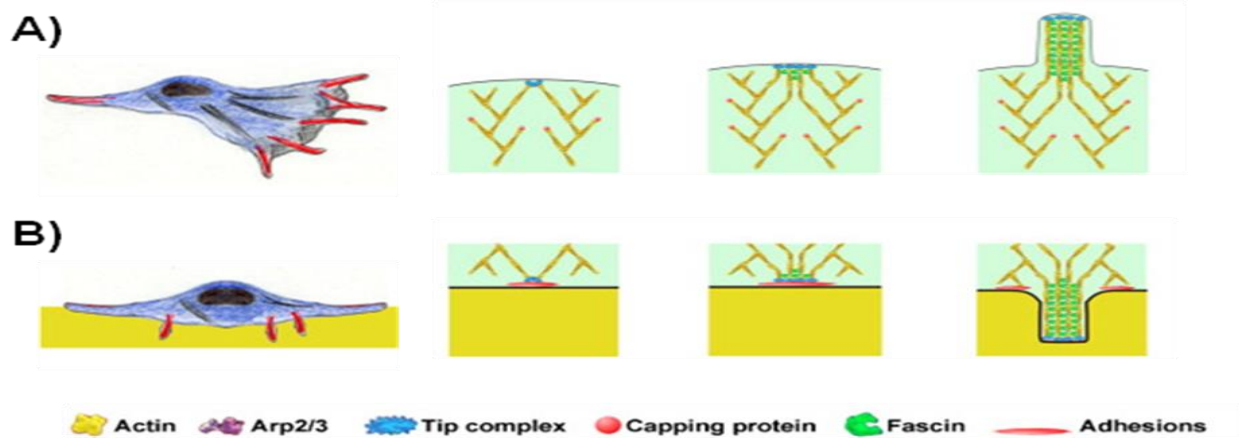


Figura 10. Rappresentazione schematica della morfologia, della struttura e delle proteine coinvolte nella formazione di filopodi (A) e invadopodi (B) (modificata da Vignjevic e Montagnac, 2008).

METALLOPROTEINASI della MATRICE

Le metalloproteinasi della matrice (MMPs), note anche come matrixine, sono una famiglia di proteasi zinco-dipendenti che agiscono a livello extracellulare a pH neutro (Birkedal-Hansen et al., 1993; Nagase e Woessner, 1999). Nei vertebrati, attualmente, si conoscono 28 tipi diversi di MMP e, in base alla specificità di substrato, all'omologia di sequenza e all'organizzazione dei diversi domini proteici, si possono distinguere sei gruppi.

Classificazione delle MMP

Collagenasi interstiziali: rappresentate dalla collagenasi 1 (MMP-1) prodotta dai fibroblasti; dalla collagenasi 2 (MMP-8), tipica dei polimorfonucleati neutrofili; dalla collagenasi 3 (MMP-13) e dalla collagenasi 4 (MMP-18) (Xenopus). Le MMP appartenenti a questo gruppo principalmente degradano il collagene interstiziale di tipo I, II, III, VII e X. Tuttavia, possono digerire anche altre molecole appartenenti alla matrice extracellulare e non.

Gelatinasi: gelatinasi A (MMP-2) e gelatinasi B (MMP-9). Degradano il collagene di tipo IV, V, VII, la fibronectina, l'elastina e la gelatina (cioè il collagene denaturato). La MMP-2, ma non la MMP-9, degrada anche il collagene di tipo I, II e III (Visse e Nagase, 2003).

Stromelisine: tipo 1 (MMP-3) e 2 (MMP-10). Hanno simile specificità di substrato, ma la MMP-3 è dotata di una maggiore attività proteolitica rispetto alla MMP-10. Oltre a digerire diversi componenti della ME, la MMP-3 svolge un importante ruolo nell'attivazione di diverse MMP in forma proenzimatica; in particolar modo la sua azione è fondamentale nel convertire la forma parzialmente attivata della MMP-1 nella forma attiva. La stromelisina di tipo 3 (MMP-

11) è dotata di specificità di substrato e di sequenza che differiscono dalla MMP-3 e per tale motivo spesso viene considerata a parte.

Matrilisine: 1 (MMP-7) e 2 (MMP-26). Hanno un'ampia specificità di substrato e degradano fibronectina, laminina, proteoglicani e le regioni non-elicoideali del collagene IV. La MMP-7, in particolare, provvede alla processazione di diverse molecole di superficie come la pro- α -defensina, il ligando del Fas, il pro-tumor necrosis factor α (pro-TNF α) e la E-caderina.

MMP di membrana (MT-MMP): sono sei, quattro proteine transmembrana (MMP-14, MMP-15, MMP-16 e MMP-24) e due ancorate a residui di glicosil-fosfatidil-inositolo (MMP-17 e MMP-25). Ad eccezione della MT-MMP-4 (MMP-17), sono tutte in grado di attivare la MMP-2. Inoltre digeriscono vari componenti della ME e la MT-MMP-1 (MMP-14) mostra attività collagenolitica sul collagene di tipo I, II e III.

L'ultimo gruppo comprende tutte le MMP che non vengono classificate nelle precedenti categorie: sono, ad esempio, la metalloelastasi (MMP-12), la MMP-19, la enamilina (MMP-20) e la epilina (MMP-28).

Struttura molecolare delle MMP

Le MMPs sono costituite da vari domini molecolari, ciascuno dotato di una specifica funzione (**Figura 11**). In tutte le MMPs è presente, partendo dall'estremità N-terminale, un peptide segnale che determina la secrezione della proteina, il propeptide, che contiene una breve sequenza amminoacidica specifica delle MMP (PRCG[V/N]PD) indispensabile per il corretto svolgimento del processo di attivazione, e il dominio catalitico, che presenta il sito di legame per un atomo di zinco. Inoltre tutte le MMPs, con la sola eccezione della MMP-7, presentano in prossimità del terminale carbossilico un dominio con sequenza omologa all'emopexina o alla vitronectina. Le gelatinasi (MMP-2, MMP-9) sono inoltre caratterizzate da domini fibronectino-simili, importanti per la specificità di substrato, e la sola MMP-9 ha un dominio collagene-simile.

Le MT-MMP, infine, presentano un dominio transmembrana accompagnato da una sequenza citoplasmatica (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-24) oppure un dominio di legame al glicosil-fosfatidil-inositolo (MMP-17, MMP-25) ([Nagase e Woessner, 1999](#)).

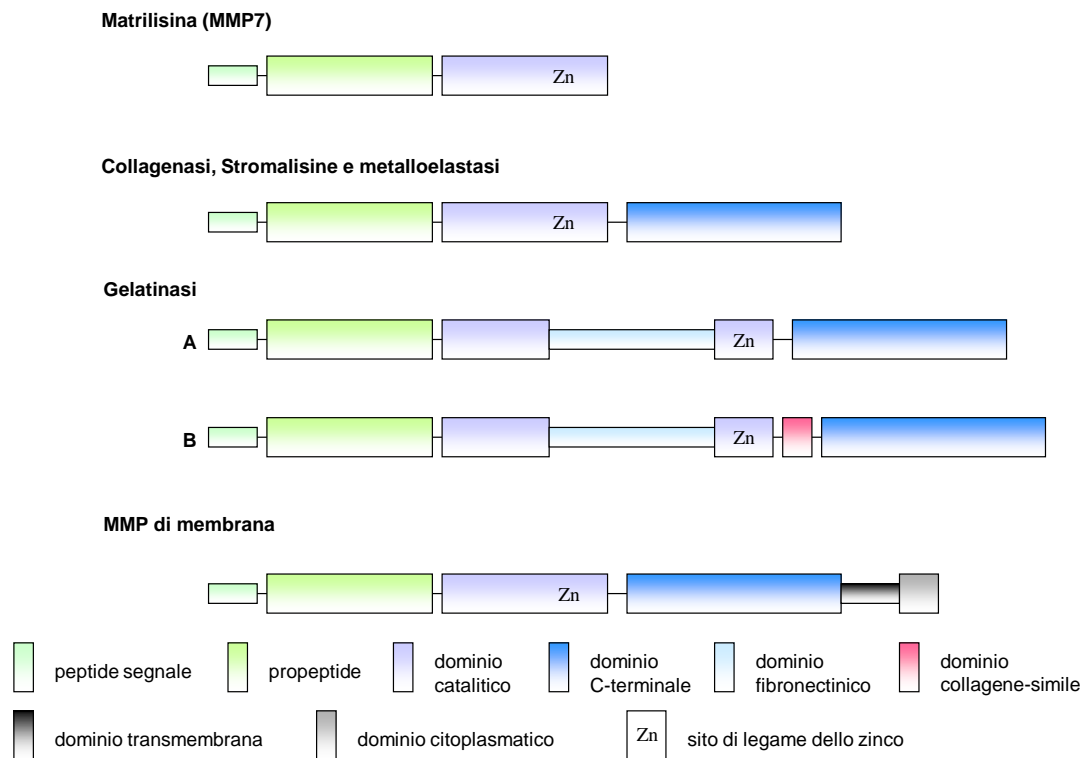


Figura 11. Schema della struttura generale delle MMPs.

Attivazione delle MMP

Tutte le MMPs vengono sintetizzate come pre-pro-enzimi e la maggior parte di esse viene secreta dalle cellule come pro-enzimi inattivi. Il processo di attivazione può procedere secondo tre differenti modalità:

- attivazione extracellulare;
- attivazione sulla superficie cellulare;
- attivazione intracellulare.

Attivazione extracellulare

Le MMPs sono attivate in vivo da altre proteinasi ed in vitro da vari agenti chimici come il glutathione disolfuro, il sodio-dodecil-solfato, la N-metilmaleimmide, ed il cloruro mercurico. L'attivazione proteolitica delle MMP (**Figura 12**) procede in modo graduale ed inizia con la rimozione di una prima parte del propeptide (porzione N-terminale di 84 amminoacidi) a formare un intermedio parzialmente attivato. Il propeptide così destabilizzato viene quindi completamente rimosso ad opera di altre MMPs attive o parzialmente attivate, principalmente dalla MMP-3, che rimuovono inoltre 15 amminoacidi all'estremità C-terminale ([Visse e Nagase, 2003](#)).

La via di attivazione più rilevante, in vivo, è quella mediata dalla plasmina. La plasmina deriva dal plasminogeno per azione dell'attivatore tissutale del plasminogeno legato alla fibrina e dell'urochinasi (uPA), legato invece ad uno specifico recettore sulla superficie cellulare (uPAR). Il fatto che queste molecole siano associate alla membrana determina la localizzazione del processo di attivazione delle MMPs e della conseguente degradazione della matrice extracellulare. È stato dimostrato che la plasmina attiva le proMMP-1, proMMP-7, proMMP-9, proMMP-10 e proMMP-13.

Il processo di attivazione graduale rappresenta un fine meccanismo di regolazione dell'attività di degradazione della matrice extracellulare da parte delle MMPs, in quanto un particolare gruppo di polipeptidi, gli inibitori tissutali delle MMPs (TIMPs), possono interferire con l'attivazione interagendo con gli intermedi parzialmente attivati.

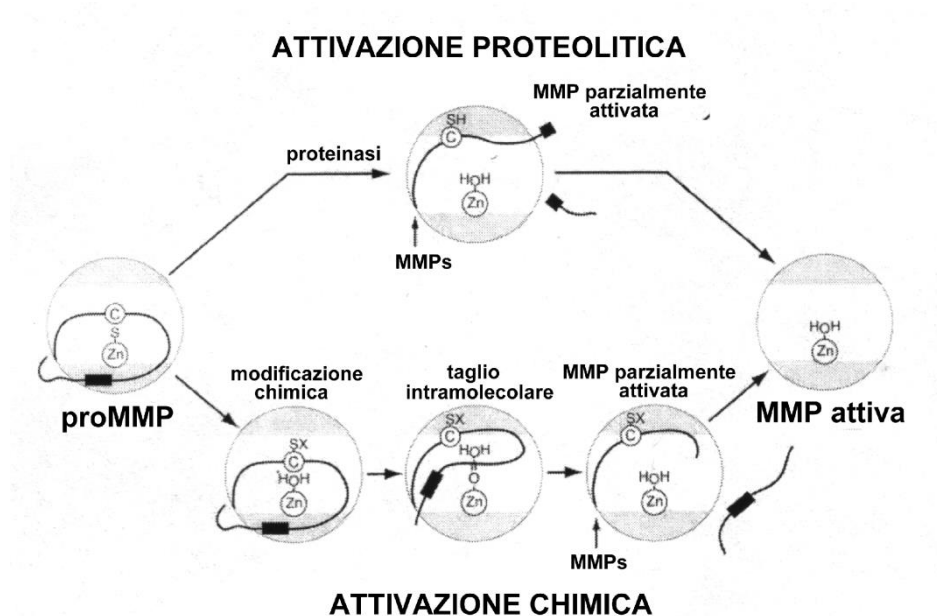


Figura 12. Schema illustrante le fasi del processo di attivazione delle MMPs.

Attivazione intracellulare

È stato dimostrato che alcune proMMP, come la proMMP-11 ([Pei e Weiss, 1995](#)), le proMT-MMP, la proMMP-23 e la proMMP-28, presentano nel dominio C-terminale una sequenza di riconoscimento per la furina, che permette l'attivazione intracellulare ad opera di questo enzima. La regolazione dei processi dipendenti dall'attività di questo gruppo di MMP dipende quindi dalla regolazione dell'espressione genica e dall'interazione con inibitori endogeni ([Visse e Nagase, 2003](#)).

Attivazione sulla superficie cellulare

Il processo di attivazione della proMMP-2 e della proMMP-13 ha luogo anche sulla superficie cellulare ed è mediato dalle MMP di membrana, con la sola eccezione della MT-MMP-4. L'attivazione ad opera della MT-MMP-1 è il fenomeno meglio caratterizzato ed è unico nel suo genere poiché richiede la presenza del TIMP-2. Infatti la proMMP-2, attraverso il dominio emopexinico, interagisce con il terminale carbossilico del TIMP-2 e questo, a sua volta, si lega ad una molecola di MT-MMP-1. La MT-MMP-1, inibita dall'interazione col TIMP-2, funge quindi da recettore per la proMMP-2. Questo complesso MT-MMP-1/TIMP-2/proMMP2 viene quindi presentato ad un'altra molecola di MT-MMP-1 vicina, che procede all'attivazione dello zimogeno eliminando il propeptide. Il dominio emopexinico della MT-MMP-1 permette il clustering delle molecole sulla superficie cellulare, evento che facilita il processo di attivazione. Infatti, la massima attivazione della pro-MMP-2 si ha per un rapporto TIMP-2/MT-MMP-1 di 0.05, il che significa che più molecole di MT-MMP-1 libere posso circondare il complesso ternario MT-MMP-1/TIMP-2/proMMP-2. L'attivazione della pro-MMP-2 ad opera della MT-MMP-2 invece è indipendente dal TIMP-2.

Infine, la MT-MMP-1 può attivare la proMMP-13 in modo indipendente da TIMP-2, ma l'efficienza di attivazione è maggiore in presenza di MMP-2 attiva ([Visse e Nagase, 2003](#)).

Regolazione dell'attività delle MMP

Alla luce di quanto esposto, si può evincere come la regolazione delle MMP possa avvenire a livelli diversi (**Figura 13**):

- regolazione della trascrizione: l'espressione dei geni delle MMP è controllata da numerose citochine che agiscono sia in modo positivo, stimolandone la trascrizione, sia in modo negativo, inibendola. Nei fibroblasti è stato evidenziato che l'interleuchina 1 (IL-1), il tumor necrosis factor α (TNF α) e gli esteri del forbolo, come il 12-O-tetradecanoilforbolo-13-acetato (TPA), sono in grado di stimolare la trascrizione delle collagenasi e delle stromelisine inducendo i fattori di trascrizione c-jun e c-fos (AP1), che interagiscono con i TPA responsive element (TRE) e i siti per AP1 presenti a livello del promotore. Il transforming growth factor- β (TGF- β), invece, ne inibisce l'espressione, inducendo un fattore di trascrizione della famiglia di fos che si lega a livello di una sequenza, detta TGF- β inhibitory element (TIE), posta a monte del promotore. Quindi, in base alle vie di trasduzione del segnale che vengono attivate e alle caratteristiche genetiche e ambientali della cellula, le proteine della famiglia di AP1 possono sia cooperare sia contrastarsi durante la transattivazione dei geni delle MMPs. A differenza delle altre MMP, la gelatinasi A (MMP-2), invece, manca nel

proprio promotore di sequenze per transattivatori noti come pure della sequenza TIE. Ne consegue che l'espressione della MMP-2 non è inibita dal TGF- β ma, al contrario, lievemente stimolata (Corcoran e Stetler-Stevenson, 1995).

- regolazione post-trascrizionale: è stato dimostrato che la regolazione di alcune MMPs può avvenire anche mediante modulazione della stabilità del messaggero. È il caso della MMP-2, in cui TPA e TGF- β alterano l'emivita dell'mRNA. Per le collagenasi e le stromelisine, invece, la stabilità del trascritto è mediata da IL-1, TNF α , come pure dal TPA e dal fattore di crescita dell'epidermide (EGF) (Corcoran e Stetler-Stevenson, 1995).
- regolazione dell'attivazione: è un processo particolarmente complesso che coinvolge la regolazione delle diverse proteine che partecipano all'attivazione (plasminogeno/plasmina, attivatori del plasminogeno e relativi inibitori, nonché i TIMPs) (Hay, 1991).
- inibizione dell'attività proteolitica: avviene ad opera principalmente dei TIMPs, che si legano al sito attivo di queste proteine in rapporto stechiometrico 1:1, inibendo così la loro attività. Oltre ad inibirne l'attività, i TIMPs agiscono anche impedendo la conversione da forma inattiva a forma attiva di queste proteasi, grazie ad un legame a livello del dominio C-terminale (Harris et al., 1984). È da considerare, infine, che il TGF- β 1 agisce indirettamente anche a questo livello, aumentando l'attività di tali inibitori.

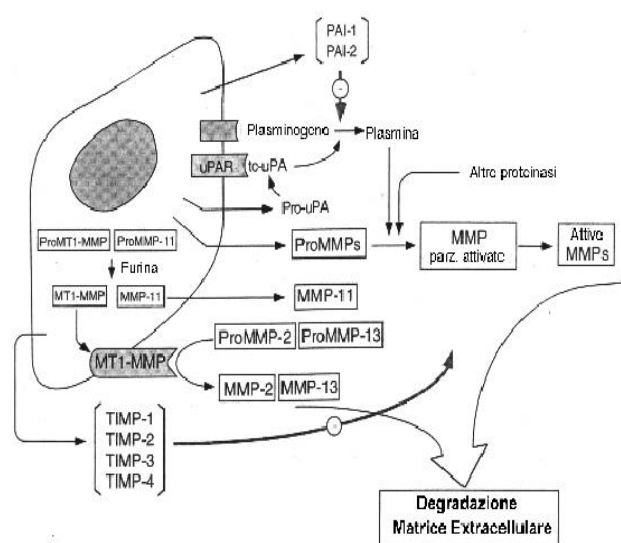


Figura 13. Schema dell'attivazione e regolazione delle MMPs

MMP ed invasività tumorale

Durante l'invasione tumorale, la digestione ed il rimodellamento della matrice extracellulare dei tessuti circostanti gioca un ruolo chiave. Numerosi studi hanno messo in evidenza la correlazione esistente tra elevati livelli di MMPs e aggressività tumorale ([Van Meter et al., 2001](#); [Yong et al., 2001](#)). Le MMPs favoriscono l'invasività tumorale degradando le proteine della matrice extracellulare, attivando sistemi a cascata di trasduzione del segnale e solubilizzando i fattori di crescita che inducono i legami all'interno della matrice stessa. Inoltre, le MMPs possono attivare altri fattori di crescita implicati nella mobilità e nella proliferazione delle cellule tumorali quale, ad esempio, il TGF- β .

Fra le MMPs, le gelatinasi MMP-2 ed MMP-9 sono le proteasi maggiormente coinvolte, in quanto in grado di degradare il collagene di tipo IV delle membrane basali. In particolare, la MMP-2 è stata indicata quale uno dei principali mediatori dell'invasività tumorale e la sua espressione risulta up-regolata in tumori altamente maligni, quali i glioblastomi ([Tysnes e Mahesparan, 2001](#)); inoltre, la sua espressione è stata correlata al grado di invasività del tumore stesso ([Rooprai e McCormick, 1997](#); [Vince et al., 1997](#)).

In particolare, per quanto riguarda il PDAC, è stata evidenziata una significativa correlazione tra i livelli di espressione e attivazione della MMP-2 e del suo attivatore specifico MT1-MMP, e il potenziale invasivo delle cellule neoplastiche, in quanto questi risultano over-espressi nelle linee di PDAC rispetto alle cellule di dotto pancreatico normali.

Una chiara correlazione è stata dimostrata anche tra l'attivazione e l'espressione di MMP-2, MT1-MMP e parametri come l'espressione del collagene, in accordo con lo sviluppo della reazione desmoplastica che caratterizza il PDAC ([Ellenrieder et al., 2000](#)).

L'analisi in vitro dell'espressione di MMP-9 nelle cellule di PDAC e di adenocarcinoma mucinoso rivela una forte correlazione con la presenza di muco, il quale facilita la propagazione del tumore. Inoltre, la sua espressione è stata rilevata in tutti i pazienti con metastasi distali. Contribuendo all'aggressività del PDAC, l'espressione di MMP-9 correla con una minor sopravvivenza ed una prognosi infausta ([Pryczynicz et al., 2007](#)).

MARCATORI DI EMT

I marcatori cellulari, in generale, sono degli indicatori che permettono di definire un fenotipo cellulare e di inquadrare una situazione fisiologica o patologica. Nel contesto della EMT si possono utilizzare come marcatori alcune molecole rappresentative dei fenotipi epiteliale e mesenchimale. I principali marcatori epiteliali sono la E-caderina e la β -catenina descritte in precedenza. Tra i marcatori di fenotipo mesenchimale troviamo ad esempio la N-caderina (o

caderina neurale), la cui espressione è caratteristica dello “switch” di caderine che si può osservare in corso di EMT; durante tale processo la perdita di E-caderina è accompagnata dalla concomitante espressione della N-caderina, in grado di creare interazioni più deboli con le catenine rispetto alla E-caderina, favorendo quindi la migrazione e l’invasione cellulare (Lamouille et al., 2014). Un ulteriore marcatore mesenchimale è la vimentina, la proteina che costituisce i filamenti intermedi delle cellule mesenchimali. La sua espressione de novo si correla con la down-regolazione delle citocheratine epiteliali. Essa non è però un marcatore specifico, in quanto è espressa anche in cellule di tipo diverso come, ad esempio, leucociti e cellule endoteliali ed in alcuni carcinomi in cui non vi è evidenza di EMT (Zavadil e Bottinger, 2005). Un altro importante marcatore di EMT è l’ α SMA, tipicamente espressa in cellule con capacità contrattili e di movimento. Questa molecola è tipica di fibroblasti attivati, detti miofibroblasti, che intervengono in stati infiammatori e durante il processo di fibrosi producendo componenti della ME. Anche il collagene di tipo I, normalmente sintetizzato e secreto da cellule mesenchimali quali i fibroblasti, è un marcatore di EMT. Un interessante marcatore più legato alla capacità di migrazione, in particolare di tipo collettivo, è la podoplanina. La podoplanina è una piccola proteina “mucin-like” che risulta over espressa in una serie di diversi tumori, suggerendone un ruolo nella progressione tumorale (Kato et al., 2005, Schact et al., 2005, Kimura e Kimura, 2005, Martin-villar et al., 2005, Wicki et al., 2006). Il reale contributo di questa proteina alla progressione tumorale non è stato ancora definito, ma si ipotizza un suo ruolo nella formazione di filopodi e quindi nella migrazione e invasione cellulare.

COLTURE CELLULARI 3D: SFEROIDI

In un tessuto, le interazioni cellula-cellula e cellula-ME sono mediate da segnali biochimici e meccanici e costituiscono un network di comunicazione che permette il mantenimento della specificità e dell’omeostasi del tessuto stesso. Le colture cellulari 3D, quali gli sferoidi, consentono di ristabilire tali interazioni e pertanto mimano la specificità dei tessuti meglio che le convenzionali colture cellulari in monostrato. Evidenze sperimentali hanno dimostrato che le cellule coltivate in 3D presentano differenti livelli di espressione genica, se paragonate a cellule coltivate in 2D su monostrato. Per esempio, in cellule di melanoma coltivate in monostrato su plastica si assiste a up- o down-regolazione di geni rispetto alle stesse cellule coltivate in sferoidi 3D. In particolare, è interessante il riscontro che i geni up-regolati negli sferoidi sono gli stessi che si presentano up-regolati nel tumore *in vivo* (Ghosh et al., 2005). Lo

studio delle cellule di PDAC coltivate in 3D potrebbe quindi permettere di approfondire le conoscenze sulla biologia di questo tumore.

SCOPO DELLO STUDIO

Il processo di EMT gioca un ruolo chiave nella progressione dei carcinomi, incluso il PDAC, un carcinoma caratterizzato da una importante reazione desmoplastica consistente nell'accumulo di componenti della ME, che possono interagire con le cellule tumorali influenzandone il fenotipo e favorendone la progressione tumorale.

In un tessuto, le interazioni cellula-cellula e cellula-ME sono mediate da segnali biochimici e meccanici e costituiscono un network di comunicazione che permette il mantenimento della specificità e dell'omeostasi del tessuto stesso. Le colture cellulari 3D, quali gli sferoidi, consentono di ristabilire tali interazioni e pertanto mimano la specificità dei tessuti meglio che le convenzionali colture cellulari in monostrato.

Al fine di meglio comprendere il fenotipo ed il comportamento delle cellule di PDAC, e il ruolo della EMT nella biologia di tale tumore, scopo di questo studio è stato quello di caratterizzare l'espressione dei principali marcatori di EMT mediante microscopia a fluorescenza e confocale in cellule di PDAC in diverse condizioni sperimentali.

Il lavoro svolto si è quindi articolato in due parti: in una prima fase sono state caratterizzate, principalmente mediante immunofluorescenza e tecniche di proteomica, tre differenti linee cellulari commerciali di PDAC coltivate in monostrato, con particolare attenzione all'analisi dei principali marcatori di transizione epitelio mesenchimale (EMT).

Nella seconda parte del lavoro abbiamo valutato come l'arrangiamento 3D delle cellule potesse influenzarne il fenotipo in relazione all'espressione di alcuni marcatori di EMT; a tale scopo sono stati allestiti sferoidi 3D di cellule di PDAC, che sono stati poi analizzati mediante immunofluorescenza, western blot e real-time pcr.

I dati ottenuti da questo studio potranno permettere di approfondire la conoscenza del fenotipo delle cellule di PDAC e di chiarire il ruolo svolto dalla EMT nella progressione del PDAC. Le cellule di PDAC coltivate in sferoidi 3D potrebbero infatti rappresentare un modello di coltura che simuli le condizioni fisiologiche di crescita, permettendo di analizzarne i processi cellulari ed il comportamento alla base della progressione di questo tipo di tumore.

MATERIALI E METODI

COLTURE CELLULARI

Per questo studio sono state utilizzate tre linee cellulari umane di carcinoma duttale del pancreas (PDAC): HPAF-II, HPAC, e PL45 (ATCC).

Le cellule sono state coltivate in fiasche T75, in terreno di coltura DMEM addizionato con il 10% di siero bovino fetale (FBS) inattivato al calore (30 minuti a 56°C), glutammina 2 mM, antibiotici (100 U/ml penicillina, 0.1 mg/ml streptomicina), anfotericina B 0.25 µg/ml, e incubate a 37°C con il 5% di CO₂.

Le colture sono state propagate fino ad ottenere il numero di cellule necessario per le diverse valutazioni. La propagazione della coltura prevede, una volta giunta all'80% di confluenza, che le cellule siano subcoltivate in nuove fiasche T75 per il successivo passaggio in coltura, secondo il seguente protocollo:

- il terreno di coltura è stato eliminato e le cellule sono state lavate con Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (PBS) per eliminare eventuali residui di FBS e facilitare in questo modo il distacco delle cellule stesse dalla fiasca;
- la coltura è stata incubata con 3 ml di tripsina 0.25% + EDTA 0.1% al fine di ottenere il distacco delle cellule dal substrato;
- la tripsina viene inattivata con 3 volumi di DMEM completo;
- le cellule vengono centrifugate (200 xg per 6 minuti) e, dopo rimozione del surnatante, il pellet ottenuto è stato risospeso in DMEM;
- la sospensione cellulare è stata trasferita in una nuova fiasca T75.

Il terreno delle colture è stato sostituito due volte alla settimana con DMEM completo.

La vitalità cellulare ad ogni passaggio è stata verificata mediante l'esclusione del Trypan blue, che non è in grado di penetrare nelle cellule vive e che quindi possono essere distinte da quelle morte, che al microscopio appaiono colorate in blu.

Al termine delle incubazioni i medium di coltura sono stati prelevati e conservati a -20°C. Per le analisi molecolari le cellule sono state raccolte dopo distacco con tripsina-EDTA, e processate per la preparazione dei lisati cellulari. Per le valutazioni morfologiche mediante immunofluorescenza, le cellule sono state coltivate su vetrini coprioggetto, e successivamente fissate e conservate a -20°C fino al momento dell'utilizzo.

Tutte le valutazioni sono state effettuate su cellule in coltura per 48 ore. Ogni campione è stato coltivato in duplicato.

Per l'analisi della morfologia cellulare le cellule sono state piastrate in piastre multiwell da 6 pozzetti (300.000 cellule/pozzetto). 48 ore dopo che le cellule si sono attaccate ed hanno raggiunto la subconfluenza, sono state fotografate al microscopio a contrasto di fase (Leica DM IL) a ingrandimento 20x mediante una fotocamera (Leica DFC 420) collegata a microscopio rovesciato. Ogni campione è stato valutato in duplicato.

ALLESTIMENTO DI COLTURE CELLULARI 3D: SFEROIDI

L'analisi del fenotipo delle cellule di PDAC coltivate in sferoidi 3D è stato effettuato sulle cellule HPAC. Per la preparazione degli sferoidi, le cellule HPAC (5×10^3) sono state seminate in pozzetti di piastre multiwell da 24 pozzetti rivestiti da agarosio 1% in DMEM senza siero. Per permettere l'aggregazione delle cellule a costituire gli sferoidi, le cellule vengono lasciate in incubatore per 3 giorni. Dopo il terzo giorno di coltura, gli sferoidi sono sufficientemente stabili e si può procedere al cambio del medium di coltura. I successivi cambi del medium di coltura sono stati effettuati ogni 2 giorni.

Una volta seminate, le cellule sono state osservate al microscopio a contrasto di fase dopo 72 ore, 1 e 2 settimane per valutare lo stato di aggregazione e la morfologia dello sferoide.

Al fine di evidenziare l'eventuale presenza di cellule morte o di aree necrotiche, alcuni sferoidi sono stati colorati con calceina-AM (3 mg/ml in PBS, Sigma) per 30 min at 37°C, e successivamente osservati al microscopio rovesciato a fluorescenza. La calceina-AM è un pro-fluoroforo vitale in grado di penetrare la membrana cellulare e viene utilizzato per misurare la vitalità cellulare. Infatti, il composto calceina-AM non è fluorescente ma, nelle cellule vive, viene convertito in calceina dalle esterasi intracellulari, emettendo un segnale fluorescente di colore verde.

IMMUNOFLUORESCENZA

La tecnica di immunofluorescenza è stata utilizzata per verificare il pattern di espressione delle proteine E-caderina, β -catenina, N-caderina, vimentina, α SMA, collagene I e podoplanina.

Per tale analisi le cellule sono state seminate su vetrini coprioggetto rotondi del diametro di 12 mm posti in piastre multiwell da 24 pozzetti, ad una densità di 5×10^4 cellule/pozzetto, in 500 μ l di terreno DMEM completo. Una volta che le cellule adese al vetrino hanno raggiunto la confluenza idonea, i pozzetti sono stati lavati 3 volte con PBS al fine di eliminare completamente il terreno di coltura, e le cellule sono state fissate in una soluzione di paraformaldeide al 4% e saccarosio al 2% per 10 minuti a temperatura ambiente. Sono stati

successivamente effettuati 3 lavaggi con PBS per rimuovere l'eccesso di fissativo. Dopo i lavaggi, le cellule sono state post-fissate in etanolo al 70% al fine di permeabilizzarle per la successiva incubazione e consentirne la conservazione a -20°C fino al momento dell'utilizzo.

Per l'analisi in immunofluorescenza delle colture 3D, sono stati utilizzati sferoidi free-floating. Gli sferoidi sono stati trasferiti mediante una pipetta pasteur di vetro in pozzetti di piastre multiwell da 24 pozzetti, lavati in PBS e fissati per circa 3 ore nelle stesse condizioni precedentemente descritte. Sono stati successivamente effettuati 3 lavaggi con PBS per rimuovere l'eccesso di fissativo. Dopo i lavaggi gli sferoidi sono stati post-fissati in etanolo al 70% e conservati a -20°C fino al momento dell'utilizzo.

Il protocollo di immunofluorescenza indiretta utilizzato ha previsto i seguenti passaggi:

- 3 lavaggi in PBS;
- incubazione con gli anticorpi primari overnight a 4°C: anticorpo primario monoclonale anti-E-caderina (1:2500 in PBS, Becton Dickinson), anticorpo anti-N-caderina (1:200, Santa Cruz), anticorpo monoclonale anti- β -catenina (1:150 in PBS, Novocastra), anticorpo monoclonale anti-vimentina (1:200 in PBS, Novocastra), anticorpo monoclonale anti- α SMA (1:800, Sigma), anticorpo monoclonale anti-collagene I (1:2000, Sigma Aldrich), anti-podoplanina (15 μ g/ml, Sigma Aldrich);
- 3 lavaggi in PBS per rimuovere l'eccesso di anticorpo primario;
- incubazione con l'anticorpo secondario anti-mouse/Alexa488 (1:500 in PBS, Molecular Probes, Invitrogen) per 1 ora a temperatura ambiente al buio (qualora fosse prevista l'analisi del citoscheletro actinico in questo passaggio è stata aggiunta anche falloidina-rodamina 25 μ M e 0.2% Triton X-100) ;
- dopo rimozione dell'eccesso di anticorpo secondario mediante 3 lavaggi in PBS, le cellule sono state incubate per 15 minuti a temperatura ambiente, al buio, con DAPI (1:100000 in PBS, Sigma);
- dopo 3 lavaggi in PBS, i vetrini coprioggetto sono stati montati su vetrino portaoggetti utilizzando il montante mowiol. Per quanto riguarda il montaggio dei vetrini contenenti gli sferoidi, lo sferoide è stato prelevato dal pozzetto utilizzando un puntale e posto su un vetrino copri oggetto; una volta rimosso l'eccesso di PBS, è stata posta una goccia di mowiol sullo sferoide, che è stato quindi coperto con un vetrino coprioggetto tondo del diametro di 12 mm.

I controlli negativi sono stati processati omettendo l'anticorpo primario.

L'organizzazione dei microfilamenti di actina è stata analizzata al microscopio a fluorescenza mediante l'utilizzo della falloidina-rodaminata, una micotossina in grado di legare in modo specifico l'actina in forma filamentosa (F-actina), cioè quella polimerica o oligomerica inserita nei filamenti citoscheletrici.

Le cellule coltivate sui vetrini sono state osservate al microscopio ottico a fluorescenza (Nikon Eclipse 80i) e fotografate tramite camera digitale (Nikon Ds-5Mc) oppure al microscopio confocale (Olympus FV1000), mentre gli sferoidi sono stati osservati al microscopio confocale (Olympus FV1000). Le immagini sono state infine elaborate con il software Adobe Photoshop.

ZIMOGRAFIA

La zimografia è una tecnica elettroforetica utilizzata per valutare l'attività proteolitica di enzimi separati su gel di poliacrilammide. Per quanto concerne lo studio delle MMPs, la metodica prevede la copolimerizzazione di un substrato idoneo (gelatina o collagene, ad esempio) nel gel di separazione, al fine di visualizzare sia i proenzimi sia le forme attive degli stessi. Tale procedimento permette di visualizzare sul gel, come bande chiare su fondo scuro, le bande di lisi che corrispondono sia alle forme attivate delle MMPs, sia le forme pro-enzimatiche.

I campioni contenenti l'enzima di interesse vengono sottoposti ad elettroforesi in presenza di SDS in condizioni non riducenti; tale condizione permette, una volta terminata la migrazione elettroforetica, il refolding delle proteine mediante eliminazione dell'SDS da parte di un altro detergente (Triton X-100), che permette di visualizzare sul gel, oltre alle forme attive delle MMPs, anche le forme proenzimatiche che non sono state attivate per digestione proteolitica.

Per l'analisi dell'attività delle MMPs, le cellule sono state coltivate in DMEM in assenza di siero. Dei terreni di coltura condizionati derivati dalle fiasche delle 3 linee cellulari è stata determinata la concentrazione proteica mediante metodo di Lowry. I campioni sono stati quindi addizionati con sample buffer (10% SDS, 4% saccarosio, 0.25 M Tris-HCl pH 6.8, 0.1% blu di bromofenolo) in rapporto 3:1. Ogni campione (15 µg di proteine totali) è stato sottoposto a SDS-PAGE in condizioni non denaturanti/non riducenti su un gel di poliacrilamide al 10% contenente gelatina alla concentrazione di 1 mg/ml. La corsa elettroforetica è stata effettuata a 4°C in tampone Tris-glicina. Una volta terminata l'elettroforesi, il gel è stato lavato due volte in tampone Tris-HCl 50 mM contenente Triton X-100 al 2.5% per 30 minuti, e successivamente incubato overnight a 37°C in un tampone di incubazione contenente Tris-HCl 50 mM, CaCl₂ 5 mM, NaN₃ 0.02%, pH 7,5 che permette la reazione enzimatica di digestione proteolitica della gelatina contenuta nel gel da parte delle MMPs. Dopo tale incubazione, il gel è stato colorato con blu di Coomassie R250 per almeno 30 minuti, e successivamente decolorato fino all'evidenziazione delle bande di lisi che corrispondono alla presenza dell'attività gelatinolitica

delle MMPs, e che appaiono come bande bianche all'interno del gel che rimane colorato in blu (Kleiner e Stetler-Stevenson, 1994).

Le bande di lisi sono state infine sottoposte a quantificazione mediante analisi densitometrica (UVBand, Eppendorf).

ELETTROFORESI BIDIMENSIONALE (2DE)

Per le analisi mediante 2DE, 350 µg di proteine sono stati precipitati mediante con metanolo/cloroformio al fine di eliminare tutti i sali e possibili interferenti dal campione proteico: il volume di lisato cellulare corrispondente alla quantità di proteina desiderata è stato addizionato con 4 volumi di metanolo, 1 volume di cloroformio e 3 volumi di acqua MilliQ. Dopo centrifugazione per 15 minuti a 10000g, a 4°C, la fase superiore è stata eliminata e sono stati aggiunti ulteriori 4 volumi di metanolo. Dopo una successiva centrifugazione per 15 minuti a 10000g, a 4°C, il pellet proteico è stato essiccato e risospeso nel tampone di corsa per l'isoelettrofocalizzazione (7 M urea, 2 M tiourea e 4% 3-[(3-colamidopropil)dimetilammonio]-1-propansulfonato "CHAPS"). Il campione è stato quindi addizionato con 1 mM ditiotreitolo (DTT) e 1% IPG buffer 3–10 (GE Healthcare, Milano) ed utilizzato per reidratare le IPG strip (il supporto plastico su cui è depositata l'acrilammide con immobilizzato il gradiente di pH per l'IEF) da 18 cm con range non lineare di pH 3-10 (GE Healthcare, Milano).

L'isoelettrofocalizzazione è stata condotta utilizzando un sistema Ettan IPGphor II (GE Healthcare, Milano): dopo 1 h di reidratazione passiva a 20°C, è stata effettuata una reidratazione attiva applicando 30 V al campione per 12 h, a 20°C, in modo da massimizzare l'assorbimento del campione prima della focalizzazione. Terminata la fase di reidratazione, i campioni sono stati focalizzati a 20°C per un totale di 70000 Vh, con un massimo di 8000 V.

Una volta eseguita l'isoelettrofocalizzazione, il gel è stato inizialmente equilibrato in un tampone riducente (6 M urea, 2% SDS, 30% glicerolo, 50 mM Tris-HCl (pH 8.8) e 10 mg/ml DTT) per 15 minuti a temperatura ambiente e successivamente sottoposto ad alchilazione dei gruppi sulfidrilici con un tampone di equilibratura adatto (6 M urea, 2% SDS, 30% glicerolo, 50 mM Tris-HCl (pH 8.8) e 25 mg/ml iodoacetammide) per 15 minuti a temperatura ambiente. Il gel è stato poi posizionato su di un gel di acrilammide al 12,5% e immobilizzato utilizzando 0,5% agarosio in tampone di corsa. La corsa di seconda dimensione è stata effettuata utilizzando un sistema Ettan DALTsix (GE Healthcare); il protocollo di corsa prevede una prima ora di corsa a 2 W per gel, seguito da una corsa a 10 W per gel fino a completamento.

I gel ottenuti sono stati conservati una notte in soluzione di fissaggio (40% etanolo, 10% acido acetico) e il giorno successivo sono stati colorati con Flamingo Fluorescent Stain (Biorad) secondo il protocollo della casa produttrice: una volta rimossi dalla soluzione di fissaggio, i gel

sono stati incubati per una notte in una soluzione 1X di colorante. Al termine della colorazione, i gel sono stati lavati per 10 minuti in una soluzione 0,1% Tween 20 e successivamente due volte in acqua MilliQ, prima di procedere all'acquisizione delle immagini.

Le immagini dei gel sono state poi acquisite con uno scanner laser Typhoon (GE Healthcare), utilizzando il laser verde (532 nm) per l'eccitazione del fluoroforo e il filtro 560LP per l'acquisizione, con una risoluzione di 50 nm.

Le immagini digitalizzate dei gel sono state analizzate tramite software Image Master 2D Platinum (GE Healthcare). Per l'analisi, le mappe proteiche dei lisati cellulari sono state prodotte in triplicato; le tre linee cellulari sono state poi analizzate a coppie. Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando come parametro di misura la percentuale di volume rappresentata da ciascuno spot sul totale della fluorescenza rilevata.

IDENTIFICAZIONE PROTEICA MEDIANTE SPETTROMETRIA DI MASSA

Le proteine di interesse individuate all'interno delle mappe bidimensionali mediante analisi delle immagini sono sottoposte a digestione enzimatica per le successive analisi mediante spettrometria di massa. Gli spot di interesse sono quindi ritagliati dal gel e disidratati mediante due successivi lavaggi in acetonitrile/ammonio carbonato (NH_4HCO_3) 50 mM (1:1) e acetonitrile (ACN) 100%. Gli spot sono quindi reidratati con 25mM DTT in 50 mM NH_4HCO_3 ed incubati a 56°C per 20 min per garantire la completa riduzione dei tioli proteici. Al termine della riduzione si procede all'alchilazione dei tioli con 55 mM iodoacetoamide in 50mM NH_4HCO_3 per 20 min, a temperatura ambiente, al buio. Il passaggio successivo prevede nuovamente la disidratazione degli spot come precedentemente descritto e la successiva reidratazione con 20 μl di Tripsina (12 ng/ μl) 0.01% ProteaseMAX in 50 mM NH_4HCO_3 per 10 min in ghiaccio; trascorsi i 10 min in ghiaccio sono aggiunti 30 μl di ProteaseMAX 0.01% in 50 mM NH_4HCO_3 e si procede alla digestione proteica che viene condotta a 37°C per 2 h. Al termine dell'incubazione gli spot sono centrifugati a 10000g per 1 min per raccogliere i peptidi ottenuti. Il digerito è quindi trasferito in una nuova eppendorf, addizionato con 0.5% di Acido trifluoroacetico (TFA) per inattivare la tripsina e concentrato sotto vuoto fino ad un volume di circa 5 μl . Il condensato è quindi pronto per essere miscelato con la matrice utilizzata per le successive analisi allo spettrometro di massa. Per le nostre analisi abbiamo utilizzato acido α -Ciano-4-idrossicinnamico saturo in 30% ACN, 70% TFA 0.1%, miscelato in rapporto 1:1 con il condensato; la miscela ottenuta è immediatamente depositata sul target di acciaio che servirà da supporto per la ionizzazione all'interno dello spettrometro. Le successive analisi sono state effettuate utilizzando uno spettrometro MALDI TOF-TOF AUTOFLEX III (Brucker), acquisendo gli spettri nel range di calibrazione 700-4000Da. Gli spettri m/z così ottenuti sono poi oggetto

di analisi mediante PMF (Peptide Mass Fingerprint); la lista di peptidi ottenuta è utilizzata per la ricerca in banca dati (SwissProt su piattaforma multimediale online Mascot), ponendo come modificazioni fisse la carbamidometilazione delle cisteine, come modificazione variabile l'ossidazione delle metionine e come tolleranza di massa massima 0.5 Da. Le identificazioni ottenute con uno score uguale o superiore a 56 sono considerate statisticamente significative ($p < 0.05$).

REAL-TIME PCR

L'RNA totale per le analisi mediante real-time PCR è stato isolato con il metodo Guanidina tiocianato-fenolo-cloroformio (Tri-Reagent, Sigma Aldrich). 1 µg di RNA totale è stato retro-trascritto in un volume finale di 20 µl di "reaction mix" (Biorad). Sono stati misurati i livelli di mRNA di E-caderina, Snail, Slug, Twist e Zeb1. L'espressione della GAPDH è stata utilizzata come controllo interno per normalizzare la quantità di RNA totale in ogni campione. I primers utilizzati per la reazione sono i seguenti:

Gene	Senso	Antisenso
GAPDH	CCCTTCATTGACCTCAACTACATG	TGGGATTTCCATTGATGACAAGC
E-caderina	GAACGCATTGCCACATACAC	GAATTCGGGCTTGTTGTCAT
Snail	CTTCCAGCAGCCCTACGAC	CGGTGGGGTTGAGGATCT
Slug	TGTTTGCAAGATCTGCGGC	TGCAGTCAGGGCAAGAAAAA
Twist	AGCAAGATTCAGACCCTCAAGCT	CCTGGTAGAGGAAGTCGATGTACCT
Zeb1	GAAAGTCATCCAGCCAAATGG	ACTTGTTTCTCAGCTTGGGGAATCA

Le reazioni di amplificazione sono state effettuate in piastre da 96 pozzetti in un volume finale di 20 µl per pozzetto contenenti 10µl di 1X SYBR Green Supermix (Biorad), 2 µl di template, 300 pmol di ogni primer. Ogni campione è stato analizzato in triplicato utilizzando un Bioer LineGene 9600. È stato misurato il ciclo soglia (Ct) e i livelli di espressione genica relativi a GAPDH sono stati valutati con il metodo $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

WESTERN BLOT

I lisati cellulari sono stati preparati in tampone Tris-HCl 50 mM pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 5 mM EDTA, 150 mM MgCl₂, 1% SDS, inibitori delle proteasi e 1 mM sodio ortovanadato. I lisati sono stati incubati in ghiaccio per 30 min e centrifugati a 14000g per 10

min a 4°C per rimuovere i residui cellulari. Gli estratti proteici (40 µg di proteine totali) sono stati sottoposti ad SDS-PAGE su gel di acrilammide al 10% in condizioni denaturanti e riducenti. Le corse sono state effettuate a 80V costanti secondo metodo di Laemmli ed i gel sono stati trasferiti mediante western blot a 90V per 90 min in Tris 0.025 M, glicina 192 mM , metanolo 20%, pH 8.3 su una membrana di nitrocellulosa. I livelli di espressione della E-caderina sono stati valutati mediante incubazione con anticorpo monoclonale anti-E-caderina (1:2500 in TBS, Becton Dickinson) per 1 h a temperatura ambiente, successivamente rilevato utilizzando un anticorpo secondario anti-mouse (1:6000 in TBS, Sigma Aldrich) coniugato alla perossidasi di rafano (HRP) accoppiato al sistema di rilevazione colorimetrica Opti-4CN (Biorad). Per confermare le quantità di proteina totale caricata su gel le membrane sono state poi incubate utilizzando un anticorpo anti- α -tubulina (1:2000 in TBS, Sigma Aldrich).

ANALISI STATISTICA

I dati sono stati analizzati mediante t-test o ANOVA. Sono state considerate statisticamente significative variazioni di espressione con $p < 0.05$.

RISULTATI

CARATTERIZZAZIONE DELLE TRE LINEE CELLULARI DI PDAC

MORFOLOGIA CELLULARE

L'analisi della morfologia cellulare al microscopio a contrasto di fase ha rivelato che le cellule di PDAC presentano una morfologia simil-epiteliale: esse, infatti, appaiono caratterizzate da una forma tondeggianti o poligonale e crescono come aggregati a stretto contatto fra loro (**Figura 14**).

L'analisi della morfologia cellulare ha anche permesso di osservare che le cellule HPAF-II hanno dimensioni eterogenee e spesso si possono osservare cellule di grandi dimensioni (indicate dalla freccia). Queste grandi cellule sono visibili anche nelle altre due linee cellulari, HPAC e PL45, ma sono meno frequenti.

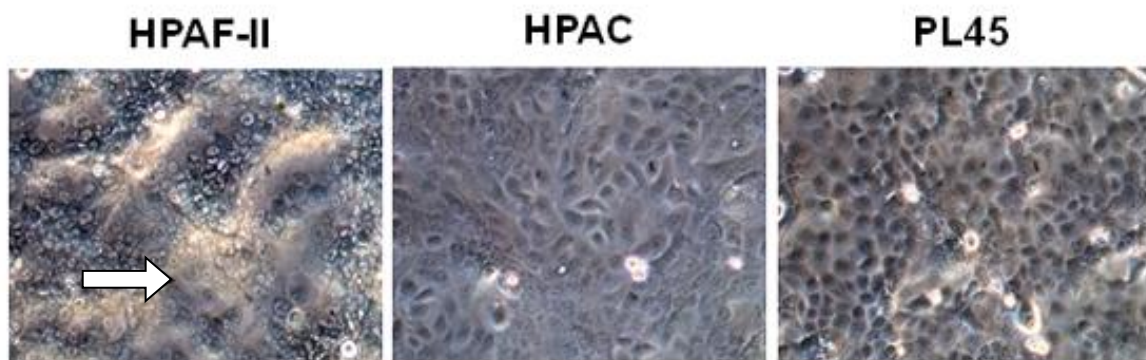


Figura 14. Microfotografie al microscopio a contrasto di fase rappresentanti la morfologia cellulare delle cellule di PDAC *in vitro*. La freccia indica la presenza di grosse cellule. Ingrandimento originale: 20x.

COMPLESSO E-CADERINA/ β -CATENINA

Dal momento che lo switch fenotipico da cellule epiteliali a cellule mesenchimali gioca un ruolo chiave nella progressione del carcinoma pancreatico, abbiamo analizzato l'espressione dei principali marcatori del fenotipo epiteliale per meglio comprendere il ruolo della EMT nella progressione del PDAC.

L'analisi in immunofluorescenza delle principali proteine costituenti le zonule aderenti ha rivelato che tutte le cellule di PDAC considerate esprimono E-caderina e β -catenina in corrispondenza della membrana cellulare (**Figura 15**), suggerendo che le cellule di PDAC

mantengono i meccanismi di adesività intercellulare mediati dalle zonule aderenti, tipici del fenotipo epiteliale pur presentando spiccate caratteristiche di malignità.

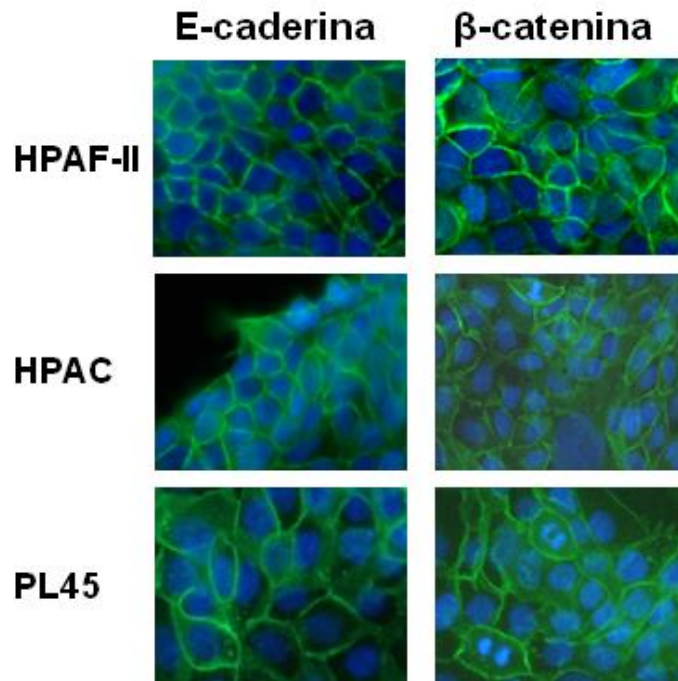


Figura 15. Microfotografie al microscopio a fluorescenza rappresentative dell'espressione e della localizzazione della E-caderina e della β -catenina nelle cellule di PDAC. In verde: E-caderina e β -catenina; in blu: DAPI. Ingrandimento originale: 60x.

CITOSCHELETRO DI ACTINA

L'organizzazione del citoscheletro actinico nelle cellule di PDAC è stata analizzata mediante utilizzo di falloidina coniugata con il fluorocromo rodamina. La falloidina, infatti, è in grado di legare l'actina filamentosa (F-actina), permettendo lo studio dell'organizzazione dei microfilamenti. L'analisi al microscopio a fluorescenza ha rivelato una diversa organizzazione dei filamenti di actina nelle tre linee cellulari di PDAC considerate (**Figura 16**).

actina

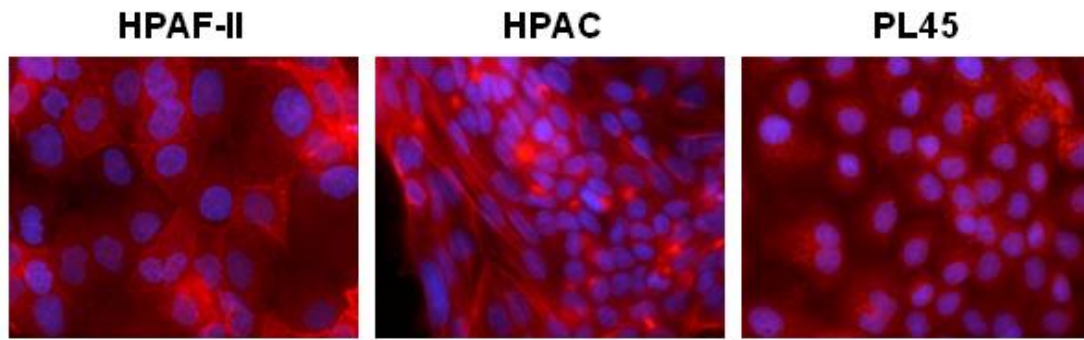


Figura 16. Microfotografie al microscopio a fluorescenza rappresentative del pattern di espressione dei microfilamenti di actina evidenziati mediante falloidina coniugata con rodamina nelle cellule HPAF-II, PL45, e HPAC. In rosso: F-actina-falloidina; in blu: DAPI. Ingrandimento originale: 60x.

Nelle cellule HPAF-II non sono state osservate evidenti stress fibers nel citoplasma e la fluorescenza della F-actina è risultata evidente a livello della membrana plasmatica, co-localizzandosi con la E-caderina e con la β -catenina.

Nelle cellule HPAC la distribuzione dei microfilamenti è risultata simile a quella osservata nelle HPAF-II, ma con una minor reattività a livello della membrana cellulare e con fasci di F-actina di frequente riscontro nel citoplasma.

Al contrario, nelle cellule PL45 la reattività della F-actina è risultata diffusa nel citoplasma, rivelando l'assenza di actina corticale tipica del fenotipo epiteliale differenziato.

ESPRESSIONE DELLA VIMENTINA

La vimentina è una delle proteine che costituiscono i filamenti intermedi delle cellule mesenchimali. Essa viene generalmente espressa dalle cellule che vanno incontro a EMT. Abbiamo quindi analizzato la sua espressione nelle cellule di PDAC mediante immunofluorescenza. L'immunoreattività per la vimentina non è risultata rilevabile, suggerendo che le cellule di PDAC considerate non esprimono questo marcatore di EMT (dati non mostrati).

ESPRESSIONE E ATTIVITÀ DELLE MMPs

Le MMPs ad attività gelatinolitica MMP-2 e MMP-9 sono marcatori di EMT e giocano un ruolo chiave nel processo di invasività neoplastica, in quanto sono in grado di degradare le membrane basali.

La loro attività è stata valutata tramite SDS-zimografia sui terreni di coltura delle cellule di PDAC. Nei medium di coltura delle cellule HPAF-II, HPAC e PL45 sono stati osservati elevati livelli ed attività di entrambe le gelatinasi, suggerendo per queste cellule di PDAC un elevato potenziale invasivo (**Figura 17**).

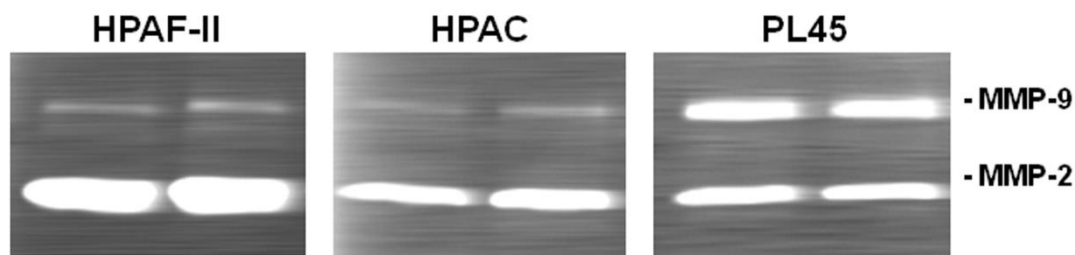


Figura 17. SDS-zimografia rappresentativa dei livelli e dell'attività delle gelatinasi MMP-2 e MMP-9 secrete nei surnatanti delle cellule di PDAC. La banda di lisi di 72 kDa corrisponde alla proMMP-2 e quella di 90 kDa alla MMP-9. I campioni sono stati analizzati in duplicato.

ANALISI ESPRESSIONE PROTEICA (2DE)

Le analisi mediante 2D elettroforesi sono state condotte in triplicato sulle tre diverse linee cellulari a disposizione, ottenendo quindi 9 mappe bidimensionali degli estratti proteici. Tali mappe sono state analizzate mediante software apposito (Image Master 2D platinum); l'analisi è stata condotta valutando i livelli di espressione proteica espressi come percentuale di intensità: ad ogni spot (proteina) nella mappa in analisi è stato assegnato un valore di intensità relativo (in percentuale) rispetto al totale del segnale acquisito nella mappa (**Figura 18**).

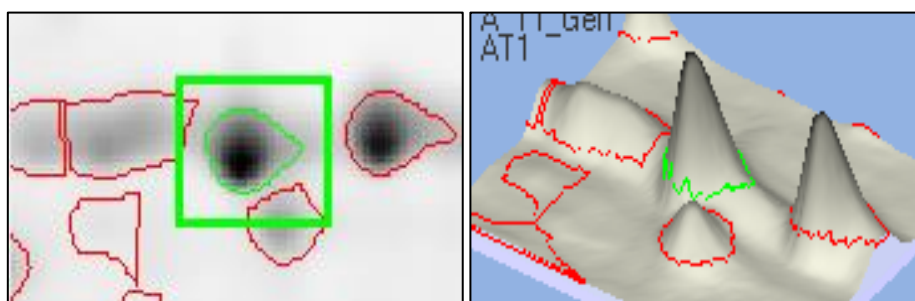


Figura 18. Esempio di valutazione dell'area (pannello di sinistra) e dell'intensità (pannello di destra) di uno spot da parte del software d'analisi

Tali valori sono stati poi utilizzati dal software per effettuare le analisi statistiche. I valori medi di intensità di ogni spot all'interno di una classe (linea cellulare) sono stati confrontati mediante test t di Student con i valori medi dello stesso spot (qualora presente) in ciascuna delle altre linee cellulari.

Dall'analisi di espressione proteica è emerso che le tre linee cellulari differiscono tra loro nei livelli di espressione di oltre un centinaio di proteine; tra queste, sono state in prima analisi selezionate quelle con differenze più significative (quasi 100) e successivamente ulteriormente ridotte cercando di mantenere le proteine che avessero livelli di espressione sufficienti per le

successive analisi. Questa seconda selezione ci ha permesso di individuare circa 50 proteine di interesse (**Figura 19a, 19b e 19c**) che sono state poi soggette ad analisi mediante spettrometria di massa che ci ha permesso di identificare in modo univoco ($p < 0.05$) 44 diverse proteine o isoforme proteiche (**Tabella 1a, 1b e 1c**).









































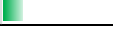




Spot n°	SwissProt ID	Proteina	HPAC	HPAF II	PL45
1	P15311	Ezrin			
2	P29401	Transketolase			
3	P29402	Transketolase			
9	P06733	Alpha-enolase			
10	P06733	Alpha-enolase			
13	P08727	Keratin, type I cytoskeletal 19			
15	P08727	Keratin, type I cytoskeletal 19			
16	P08727	Keratin, type I cytoskeletal 19			
20	P09525	Annexin A4			
21	P08758	Annexin A5			
26	P60174	Triosephosphate isomerase			
27	P52565	Rho GDP-dissociation inhibitor 1			
33	P37802	Transgelin-2			
35	P23528	Cofilin-1			
40	P09382	Galectin-1			

Tabella 1a. Tabella riassuntiva delle proteine identificate overesprese nelle cellule HPAC: da sinistra, sono indicati i numeri corrispondenti agli spot sulle mappe bidimensionali, il codice identificativo della proteina identificata su Swissprot, il nome della proteina e, in verde, i livelli di espressione normalizzati di ogni proteina nelle tre linee cellulari.

















































Spot n°	SwissProt ID	Proteina	HPAC	HPAF II	PL45
14	P30740	Leukocyte elastase inhibitor			
17	P08865	40S ribosomal protein SA			
19	P36952	Serpin B5			
22	P09525	Annexin A4			
24	Q06323	Proteasome activator complex subunit 1			
25	P04792	Heat shock protein beta-1			
29	P09211	Glutathione S-transferase P			
30	P09211	Glutathione S-transferase P			
31	P09211	Glutathione S-transferase P			
34	P15531	Nucleoside diphosphate kinase A			
38	Q14019	Coactosin-like protein			
45	P10809	60 kDa heat shock protein			
47	P09525	Annexin A4			
48	P09455	Retinol-binding protein 1			
49	P40121	Macrophage-capping protein			
50	P05091	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial			

Tabella 1b. Tabella riassuntiva delle proteine identificate overesprese nelle cellule HPAF-II: da sinistra, sono indicati i numeri corrispondenti agli spot sulle mappe bidimensionali, il codice identificativo della proteina identificata su Swissprot, il nome della proteina e, in verde, i livelli di espressione normalizzati di ogni proteina nelle tre linee cellulari.








































Spot n°	SwissProt ID	Proteina	HPAC	HPAF II	PL45
4	P10809	60 kDa heat shock protein			
5	P30101	Protein disulfide-isomerase A3			
6	P05787	Keratin, type II cytoskeletal 8			
7	P05787	Keratin, type II cytoskeletal 8			
8	P05787	Keratin, type II cytoskeletal 8			
11	P06733	Alpha-enolase			
12	P26641	Elongation factor 1-gamma			
23	O00299	Chloride intracellular channel protein 1			
32	P04179	Superoxide dismutase [Mn]			
36	P62937	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A			
37	P62937	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A			
39	P29373	Cellular retinoic acid-binding protein 2			
44	P10809	60 kDa heat shock protein			

Tabella 1c. Tabella riassuntiva delle proteine identificate overespresso nelle cellule PL45: da sinistra, sono indicati i numeri corrispondenti agli spot sulle mappe bidimensionali, il codice identificativo della proteina identificata su Swissprot, il nome della proteina e, in verde, i livelli di espressione normalizzati di ogni proteina nelle tre linee cellulari.

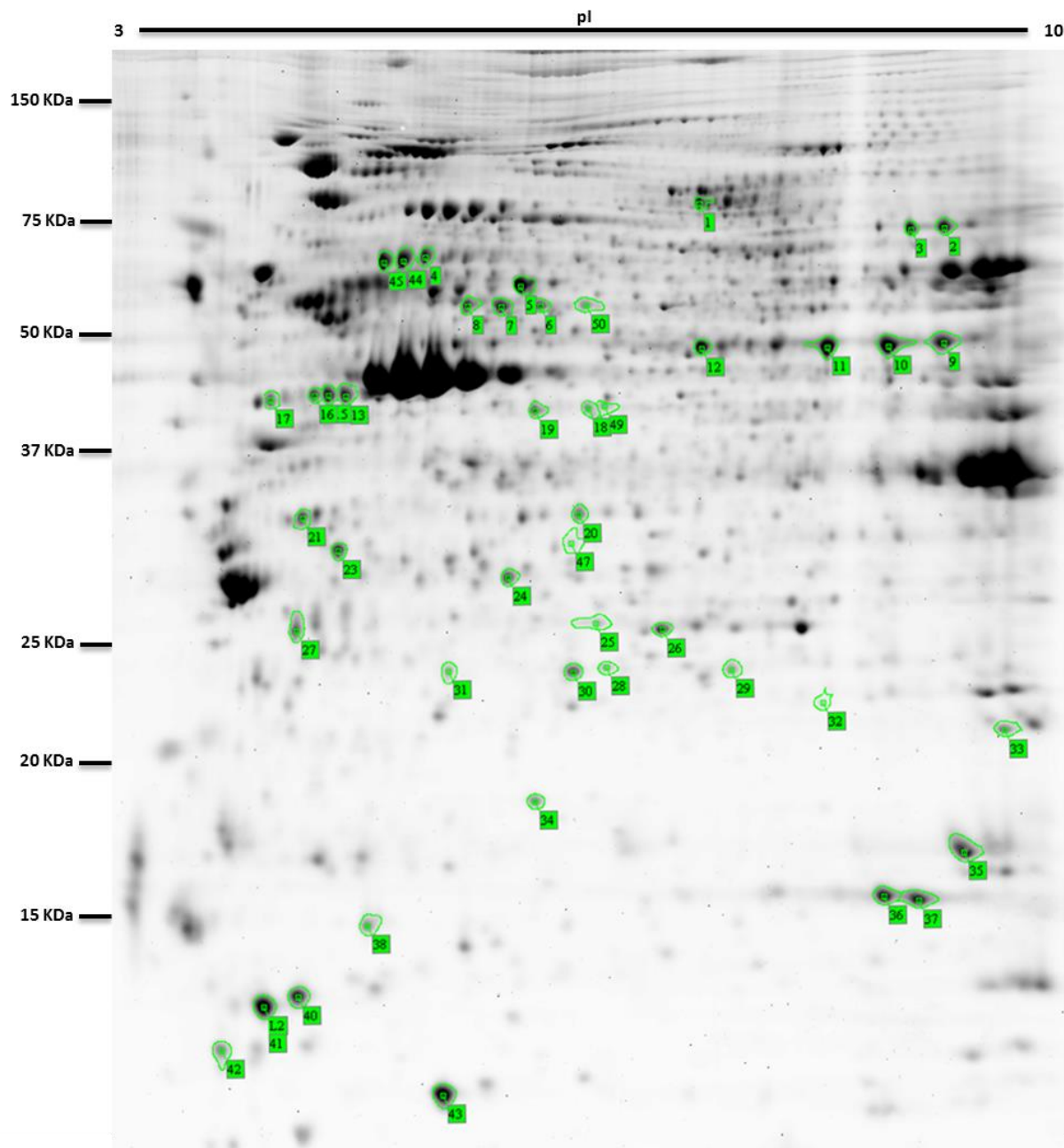


Figura 19a. Esempio di mappa bidimensionale di HPAC. In verde e numerati sono indicati gli spot utilizzati per l'identificazione delle proteine mediante spettrometria di massa.

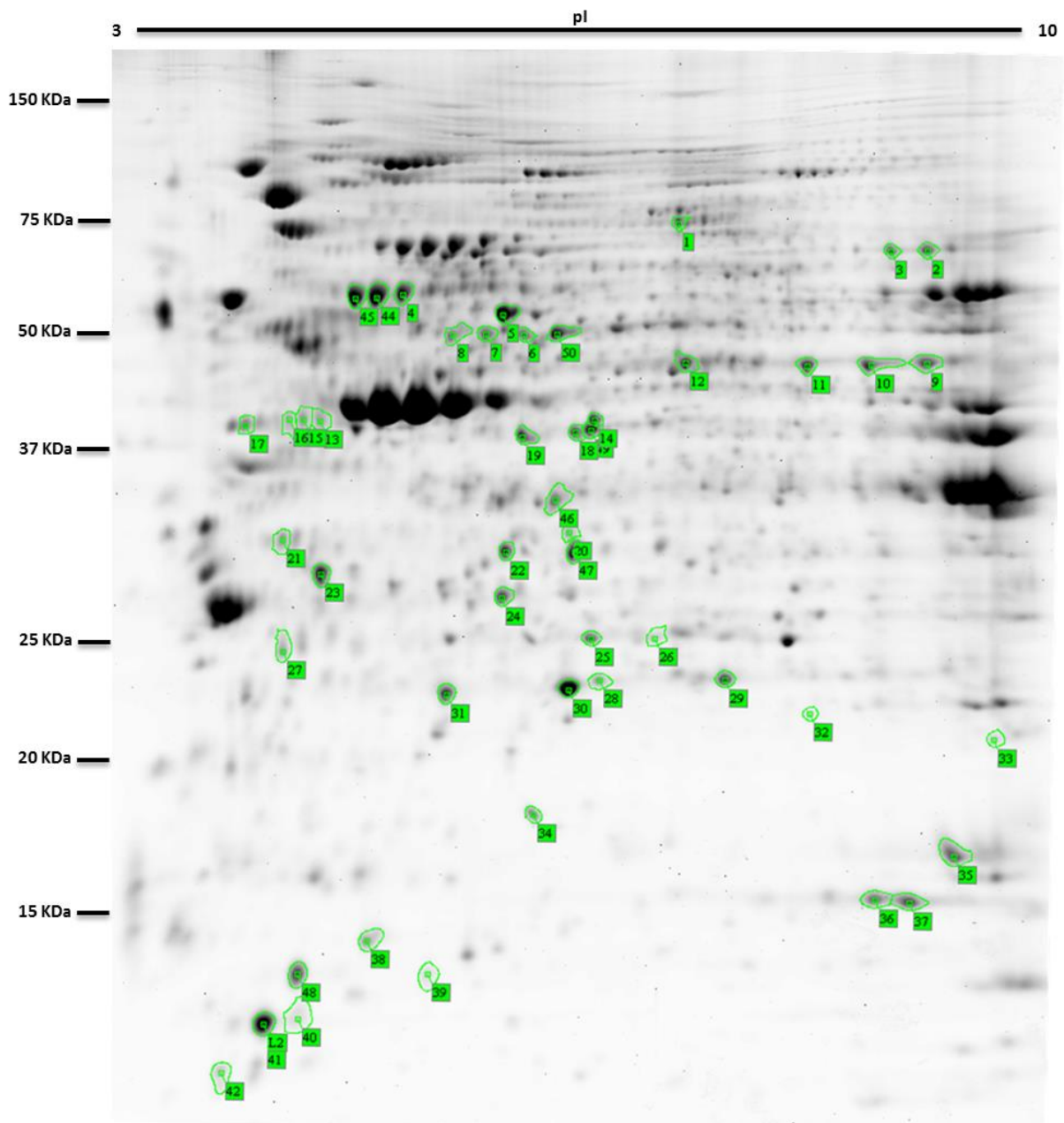


Figura 19b. Esempio di mappa bidimensionale di HPAF II. In verde e numerati sono indicati gli spot utilizzati per l'identificazione delle proteine mediante spettrometria di massa.

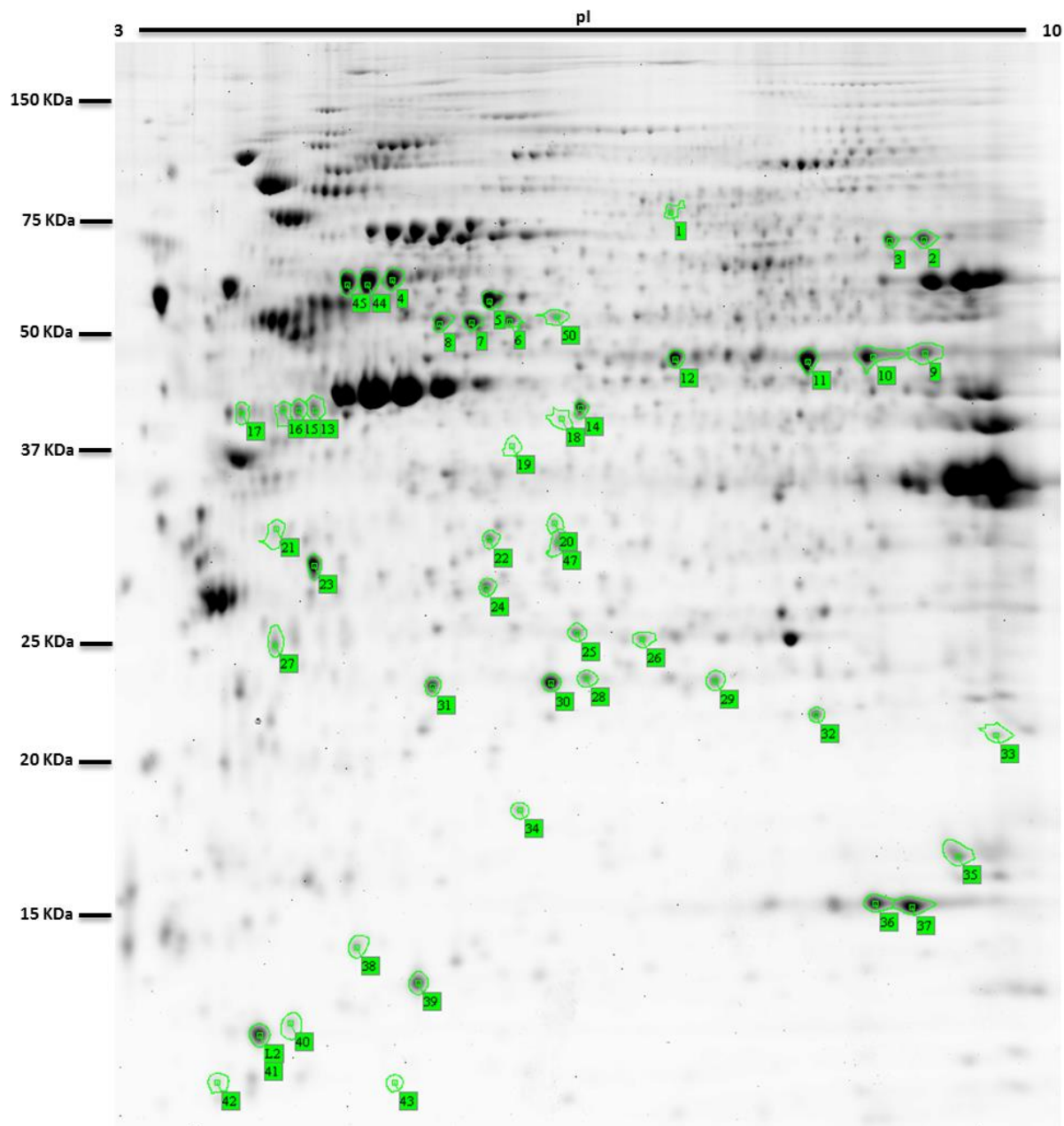


Figura 19c. Esempio di mappa bidimensionale di PL45. In verde e numerati sono indicati gli spot utilizzati per l'identificazione delle proteine mediante spettrometria di massa.

CARATTERIZZAZIONE DELLE CELLULE DI PDAC IN COLTURE 3D

SFEROIDI DI CELLULE HPAC

Lo studio dell'organizzazione tridimensionale delle cellule di PDAC è stata effettuata sulle cellule HPAC. La prima parte di questo studio è stata focalizzata sulla caratterizzazione degli sferoidi ottenuti al fine di definirne le caratteristiche morfologiche e di vitalità cellulare. Successivamente, gli sferoidi sono stati sottoposti ad analisi dei marcatori di EMT mediante immunofluorescenza, real-time pcr e western blot.

Una volta seminate nei pozzetti rivestiti da agarosio, le cellule di HPAC hanno formato un aggregato evidente e stabile dopo 72 ore, che dopo 1 settimana si è mostrato maggiormente compatto, raggiungendo la massima densità e dimensione dopo 2 settimane (**Figura 20A**). Gli sferoidi ottenuti da cellule HPAC mostrano una forma irregolare e una densità cellulare non omogenea, come osservabile sia al microscopio a contrasto di fase (**Figura 20A**), sia dopo colorazione delle cellule con DAPI e osservazione con microscopio confocale (**Figura 20B**).

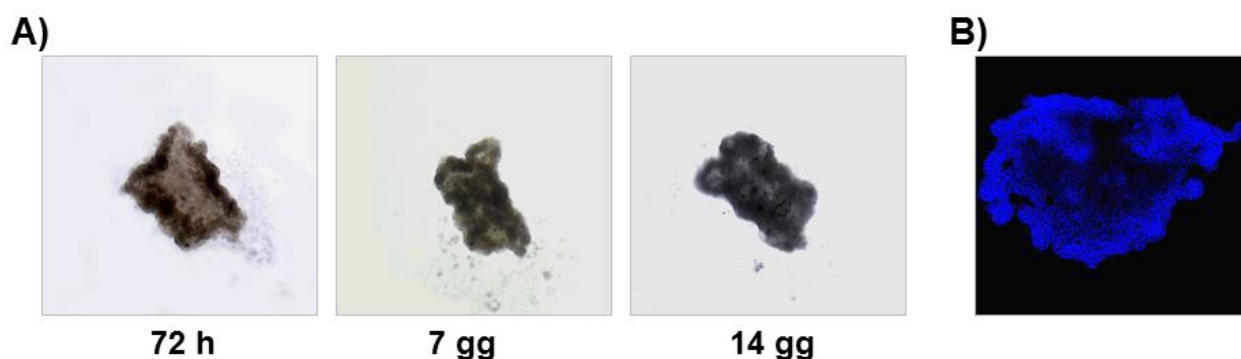


Figura 20. A) Sferoidi in coltura osservati al microscopio rovesciato ai tempi indicati. Ingrandimento originale: 4x. B) Sferoide osservato al microscopio confocale dopo incubazione con DAPI. Ingrandimento originale: 10x.

Il diametro degli sferoidi di cellule HPAC è risultato di circa 300-500 μm . Abbiamo quindi incubato alcuni sferoidi con calceina-AM per verificare eventuali zone di necrosi centrale, dove verosimilmente un ridotto apporto di nutrienti avrebbe potuto influenzare la vitalità cellulare. L'osservazione degli sferoidi al microscopio rovesciato a fluorescenza ha permesso di verificare che tutte le cellule dello sferoide erano fluorescenti e quindi metabolicamente attive (**Figura 21**).

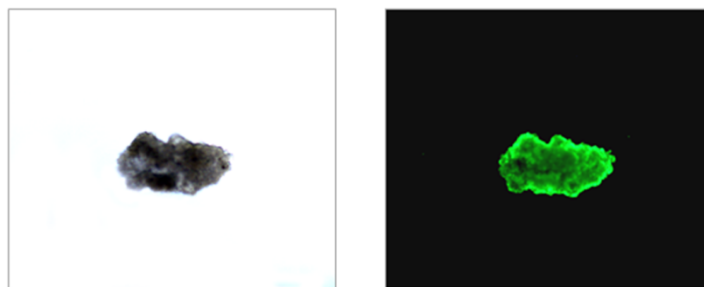


Figura 21. Sferoide osservato al microscopio rovesciato (a sinistra) e a fluorescenza (a destra) dopo incubazione con calceina-AM. Ingrandimento originale: 4x.

ANALISI DEI MARCATORI DI FENOTIPO EPITELIALE

Il passo successivo è stato quello di valutare se ci fossero differenze nell'espressione di diversi marcatori di fenotipo epiteliale o mesenchimale nelle due diverse condizioni di coltura (monostrato o sferoidi 3D). Il primo confronto è stato fatto per alcuni marcatori di fenotipo epiteliale: l'espressione del complesso E-caderina/ β -catenina è stata confermata anche nelle cellule di HPAC coltivate in sferoidi, come anche la valutazione del citoscheletro actinico. Sia nelle colture 3D che in monostrato il complesso E-caderina/ β -catenina mantiene la sua localizzazione a livello delle membrane cellulari, localizzazione tipica di un fenotipo epiteliale differenziato (**Figura 22**). L'analisi di espressione genica mediante real-time pcr ha mostrato come i livelli di mRNA della E-caderina non venissero modificati dal tipo di coltura (**Figura 23a**). L'analisi dell'espressione proteica della E-caderina ha invece evidenziato come l'aggregazione 3D influenzi il pattern elettroforetico. Abbiamo infatti potuto osservare come la forma completa della E-caderina (120 KDa) fosse maggiormente espressa quando le cellule sono coltivate in sferoidi 3D, mentre, se coltivate in monostrato, queste esprimono in misura minore la forma completa della proteina. Inoltre, si osserva un aumento dei frammenti di degradazione della E-caderina nei lisati cellulari di cellule HPAC coltivate in monostrato, evento riconducibile alla degradazione della giunzione aderente e conseguente perdita di adesione cellulare. Il peso molecolare di questi frammenti è compatibile con quello dei frammenti CT1, CT2 e CT3 descritti in letteratura ([David e Rajasekaran, 2012](#), [Ferber et al., 2008](#)) (**Figura 23b**).

Le analisi in immunofluorescenza al confocale hanno mostrato un effetto dell'arrangiamento 3D sul citoscheletro actinico: nelle colture cresciute in monostrato l'espressione dell'actina risulta localizzata soprattutto a livello del citoplasma con presenza di fibre, in accordo con la formazione di adesioni focali che garantiscono l'adesione al supporto plastico su cui sono coltivate. Se coltivate sotto forma di sferoidi 3D, le cellule sembrano invece esprimere filamenti

di actina nella fascia corticale delle cellule, pattern tipico di un fenotipo epiteliale differenziato (Figura 22).

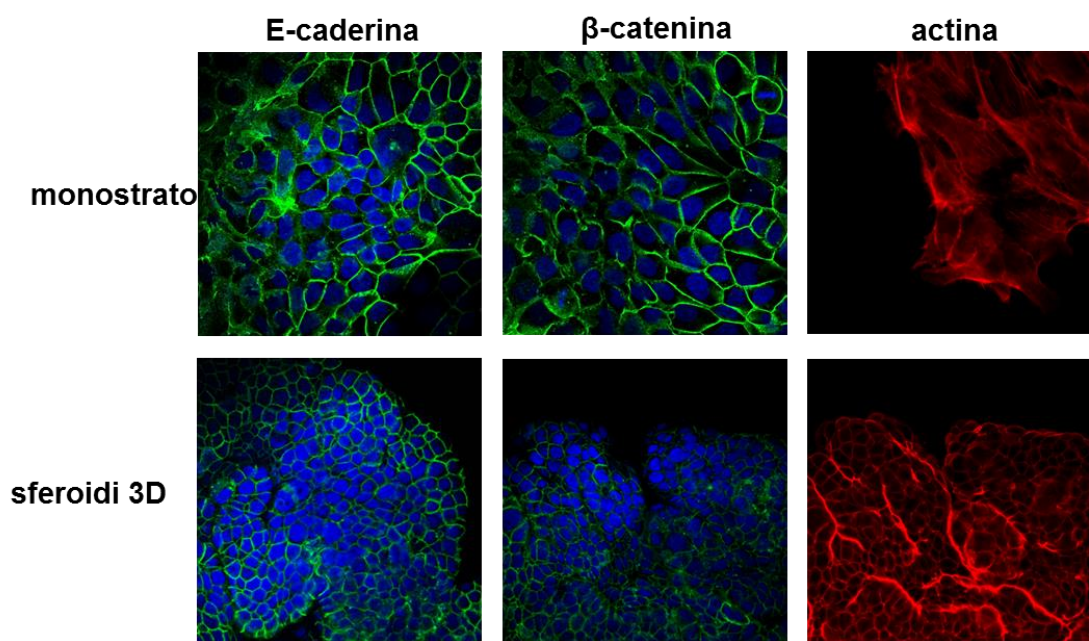


Figura 22. Microfotografie al microscopio confocale rappresentative del pattern di espressione di E-caderina, β-catenina e actina in cellule HPAC coltivate in monostrato o sferoidi 3D. In verde: E-caderina o β-catenina; in rosso: F-actina-falloidina; in blu: DAPI. Ingrandimento originale: 60x.

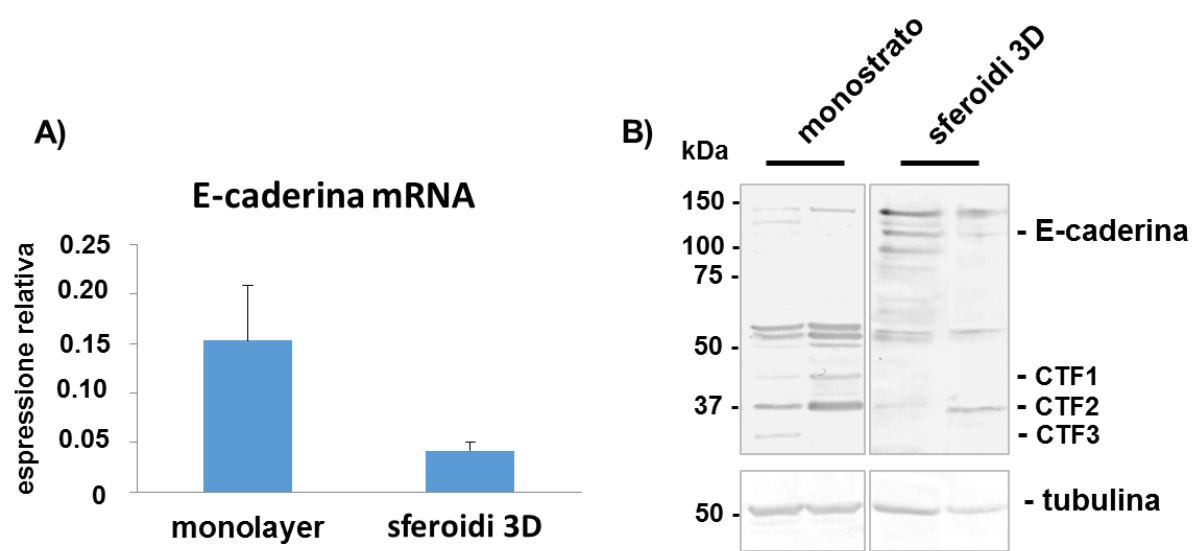


Figura 23. Livelli di espressione genica (A) e proteica (B) della E-caderina in cellule coltivate in monostrato o sferoidi 3D.

ANALISI DEI MARCATORI DI FENOTIPO MESENCHIMALE

Successivamente abbiamo analizzato, mediante immunofluorescenza e microscopia confocale, anche l'espressione di alcuni marcatori di fenotipo mesenchimale nelle due condizioni di coltura. Il primo marcatore analizzato è il collagene di tipo I (COL-I); le cellule coltivate in monostrato mostrano una limitata immunoreattività mentre negli sferoidi si può osservare un sensibile aumento di espressione nel citoplasma di alcune cellule (**Figura 24**). Tale aumento di espressione è stato osservato anche per la N-caderina; anche questo marcatore di fenotipo mesenchimale è espresso solo da poche cellule coltivate in monostrato, mentre abbiamo osservato una diffusa immunoreattività quando le cellule sono coltivate in sferoidi, sia nel citoplasma sia in corrispondenza della membrana plasmatica (**Figura 24**). In entrambe le condizioni di coltura è stata confermata la mancanza di espressione della vimentina (**Figura 24**). La α SMA è risultata essere similmente espressa in entrambe le condizioni di crescita (**Figura 24**).

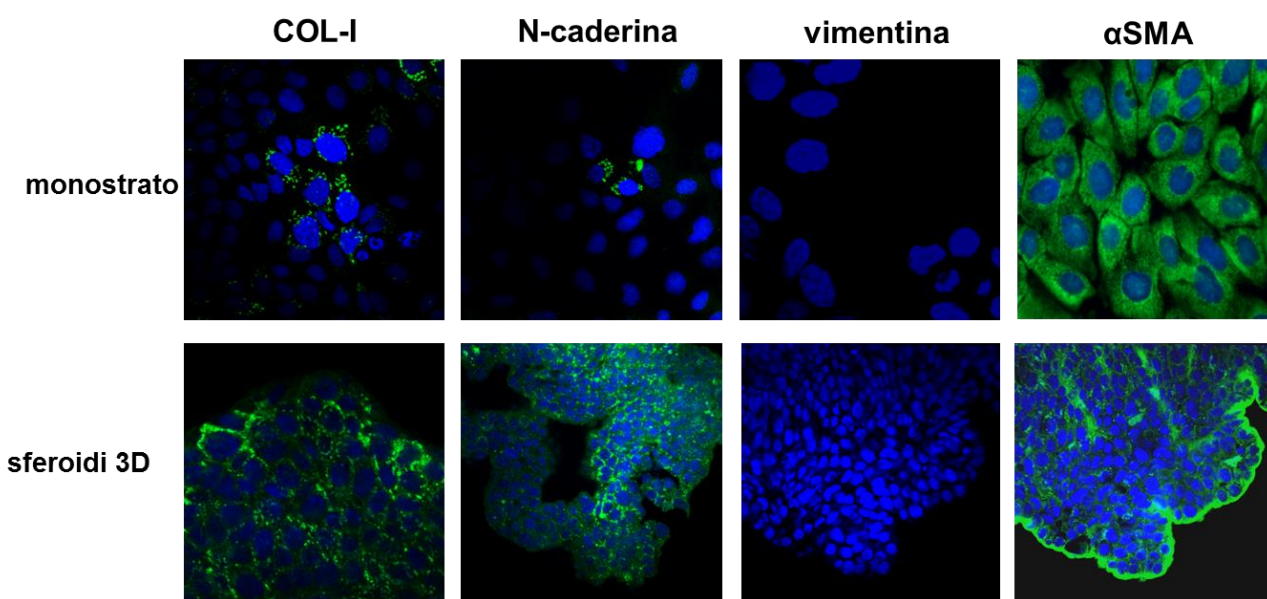


Figura 24. Microfotografie al microscopio confocale rappresentative del pattern di espressione di COL-I, N-caderina, vimentina e α SMA in cellule HPAC coltivate in monostrato o sferoidi 3D. In verde: COL-I, N-caderina, vimentina o α SMA; in blu: DAPI. Ingrandimento originale: 60x.

Snail, Slug e Zeb1 sono coinvolti nei meccanismi di EMT. L'analisi di espressione genica di tali marcatori ha rivelato bassi livelli di espressione in cellule coltivate in monostrato e in sferoidi 3D e le differenze osservate sono risultate non significative. I livelli di Twist sono risultati invece pressoché non rilevabili (**Figura 25**).

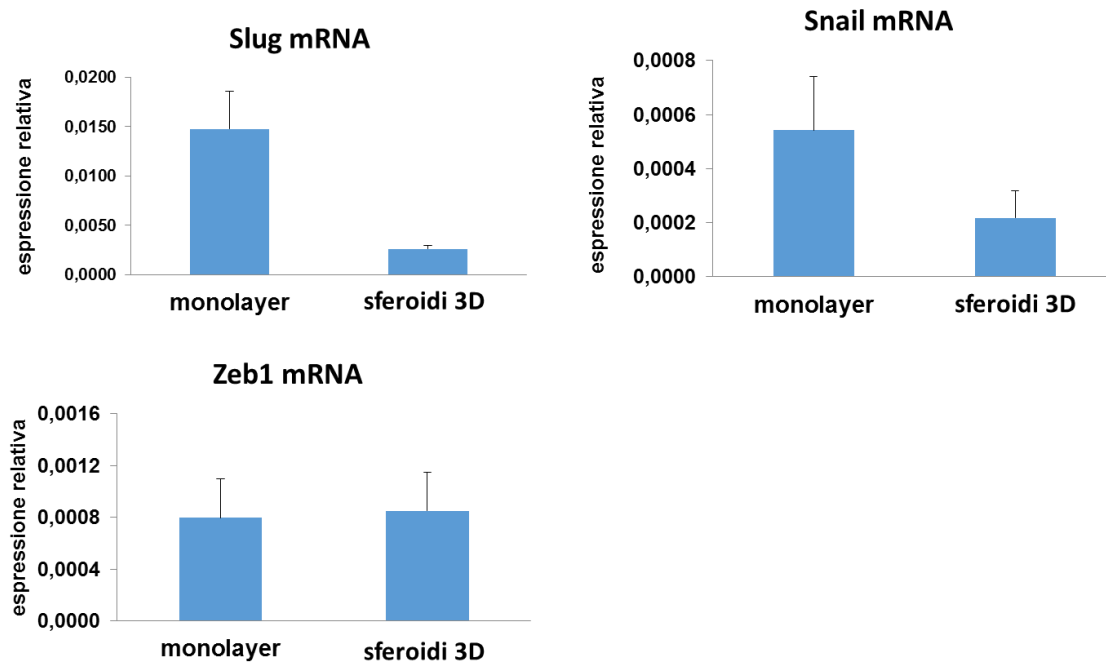


Figura 25. Livelli di espressione genica di Slug, Snail e Zeb1.

ESPRESSIONE DELLA PODOPLANINA

L'espressione della podoplanina è stata analizzata mediante immunofluorescenza. L'analisi al microscopio confocale ha evidenziato che la proteina è espressa nelle cellule HPAC in entrambe le condizioni sperimentali e che l'aggregazione 3D non ha prodotto evidenti differenze di espressione (**Figura 26**).

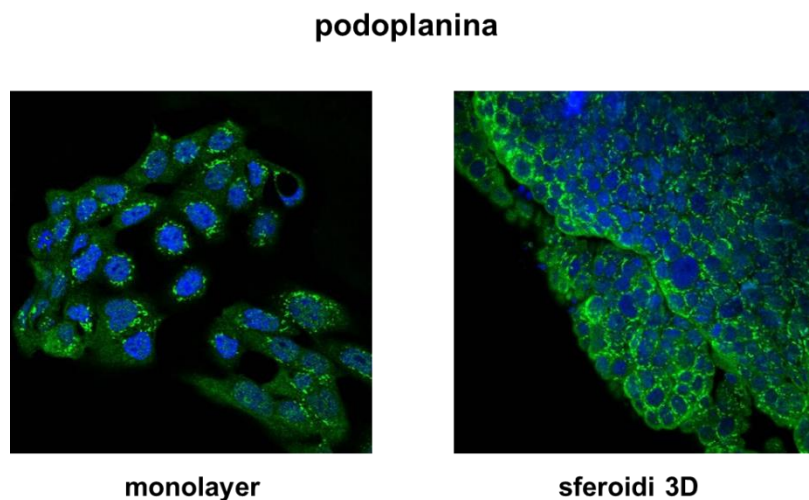


Figura 26. Microfotografie al microscopio confocale rappresentative del pattern di espressione nella podoplanina in cellule HPAC coltivate in monostrato o sferoidi 3D. In verde: podoplanina; in blu: DAPI. Ingrandimento originale: 60x.

DISCUSSIONE

CARATTERIZZAZIONE DEI MARCATORI DI EMT IN CELLULE DI PDAC

Come osservato nella maggior parte dei carcinomi, la conversione del fenotipo epiteliale delle cellule dei dotti pancreatici in fenotipo mesenchimale durante il processo di EMT gioca un ruolo chiave nella progressione del PDAC (Thiery, 2002; Cano et al., 2010). Durante la EMT la perdita delle caratteristiche tipiche delle cellule epiteliali e l'acquisizione di marcatori mesenchimali conferiscono alle cellule tumorali la capacità di invadere il microambiente circostante e di diffondersi generando metastasi a distanza (Thiery, 2002; Kang e Massagué, 2004). Uno dei principali marcatori di EMT è la perdita della E-caderina, una proteina transmembrana delle zonule aderenti, responsabile del mantenimento dell'architettura e del differenziamento delle cellule epiteliali (El Bahrawy e Pignatelli, 1998; Hirohashi, 1998; Semb e Christofori, 1998). La dissoluzione delle zonule aderenti, unitamente all'espressione di proteine mesenchimali, quali la vimentina dei filamenti intermedi e la riorganizzazione del citoscheletro actinico, caratterizzano il processo di EMT (Thiery, 2002). La perdita di adesività e l'aumento della motilità cellulare giocano un ruolo chiave nell'invasività tumorale.

L'acquisizione da parte delle cellule di carcinoma di un fenotipo metastatico consiste in vari steps e coinvolge il processo di EMT. Tale processo prevede diverse fasi in cui le cellule tumorali perdono la capacità di aderire le une alle altre in seguito alla down-regolazione della E-caderina e alla distruzione delle giunzioni aderenti e acquisiscono la capacità di degradare la membrana basale e la matrice extracellulare del microambiente circostante grazie alla secrezione di MMPs, che conferiscono a tali cellule la proprietà di invasività (Thiery, 2002). Durante la progressione del carcinoma, quindi, la EMT permette alle cellule tumorali di infiltrare i tessuti circostanti e di generare metastasi a distanza (Lee et al., 2006).

I dati di immunofluorescenza ottenuti dalla comparazione delle tre linee cellulari considerate hanno evidenziato che le cellule di PDAC presentano una evidente immunoreattività per la E-caderina e la β -catenina, espresse ai margini cellulari in corrispondenza della membrana plasmatica dove si localizzano le giunzioni intercellulari. Questo riscontro suggerisce il mantenimento dell'integrità delle zonule aderenti nelle cellule di PDAC, che presentano pertanto un fenotipo epiteliale differenziato sebbene esse siano caratterizzate da un comportamento altamente maligno. Questo primo dato è in apparente contraddizione con dati di letteratura secondo cui il processo di EMT induce la down-regolazione della E-caderina, con rilascio del complesso E-caderina/ β -catenina dalla membrana cellulare, perdita delle giunzioni cellulari (Marambaud et al., 2002) e traslocazione della β -catenina nel nucleo, dove può esercitare la funzione di regolatore della trascrizione (Van Es et al., 2003).

Dati in letteratura hanno dimostrato, inoltre, che anche i tumori del pancreas sono caratterizzati dalla ridotta espressione della E-caderina, unitamente all'aumentata espressione della N-caderina che, nei tumori primari, si correla significativamente con il grading istologico (Nakajima et al., 2004) e con il fenotipo invasivo e indifferenziato del tumore (Joo et al., 2002).

L'analisi del citoscheletro actinico ha permesso di valutare eventuali modificazioni dell'organizzazione dei microfilamenti caratteristiche della trasformazione neoplastica (Pawlak e Helfman, 2001). In particolare, una evidente riorganizzazione citoscheletrica è stata descritta durante la EMT, con perdita dei filamenti di actina subcorticali (Savagner, 2001). Nelle cellule trasformate la scomparsa dei fasci di actina subcorticali si associa alla diminuita adesività intercellulare e all'acquisizione di motilità (Ayollo et al., 2009). I dati ottenuti nelle cellule HPAF-II, HPAC e PL45 coltivate in monostrato hanno rivelato alcune differenze nei tre tipi cellulari. Nelle cellule HPAF-II la fluorescenza associata ai filamenti di actina è risultata diffusa nel citoplasma e marcatamente presente a livello dei margini cellulari, suggerendo un pattern di espressione corticale compatibile con il mantenimento di un fenotipo simil-epiteliale. Nelle cellule HPAC la fluorescenza associata ai filamenti di actina è meno evidente a livello dei margini cellulari e alcuni fasci sono visibili nel citoplasma. Diversamente, le cellule PL45 hanno rivelato una fluorescenza associata ai filamenti di actina diffusa e localizzata unicamente nel citoplasma. I risultati ottenuti sull'organizzazione dei microfilamenti nelle cellule di PDAC suggeriscono complessivamente un pattern di espressione diverso nelle tre linee cellulari considerate.

La vimentina è uno dei marcatori di EMT. Il silenziamento della vimentina induce le cellule ad acquisire una forma simil-epiteliale e dopo trasfezione con il cDNA della vimentina le cellule epiteliali adottano invece una morfologia tipica delle cellule mesenchimali, ed in esse vengono assemblati i filamenti intermedi contenenti vimentina (Mendez et al., 2010). Le cellule di PDAC utilizzate in questo studio non hanno mostrato immunoreattività per la vimentina.

Dal momento che l'invasività tumorale mediata dall'attività delle MMPs è una caratteristica importante del processo di EMT, abbiamo valutato mediante zimografia l'espressione e l'attività delle MMPs. La diffusione delle cellule tumorali nei tessuti circostanti e la formazione di metastasi a distanza è resa possibile dall'espressione di queste proteasi (Lee et al., 2006). Studi *in vitro* hanno dimostrato che il rimodellamento e la degradazione proteolitica della matrice extracellulare circostante il tumore da parte delle MMPs gioca un ruolo chiave durante l'invasività neoplastica (Liotta e Stetler-Stevenson, 1991). In tale processo, particolare importanza riveste l'attività delle MMPs ad azione gelatinolitica quali la MMP-2 e la MMP-9, in quanto esse sono in grado di degradare i componenti della membrana basale. La MMP-2, o gelatinasi 72 KDa, è ritenuta fondamentale, infatti, poiché è attiva nel degradare il collagene IV

della membrana basale (Collier et al., 1988). Essa è secreta in forma pro-enzimatica sia dalle cellule tumorali sia dalle cellule stromali e può essere attivata sulla superficie cellulare. La sua attivazione differisce da quella delle altre MMPs in quanto richiede un meccanismo localizzato sulla membrana plasmatica che coinvolge una proteina integrale di membrana, la MT-MMP1, ed un inibitore delle MMP, il TIMP-2 (Strongin et al., 1993; Strongin et al., 1995; Cao et al., 1996; Itoh et al., 2001). Dati in letteratura hanno evidenziato che la MMP-2 risulta over-espressa nel PDAC rispetto al pancreas normale e rispetto al pancreas affetto da pancreatite cronica e che una forte correlazione sussiste fra espressione della MMP-2 e potenziale invasivo delle cellule di PDAC (Ellenrieder et al., 2000). Sebbene una chiara correlazione tra espressione/attivazione della MMP-2 e stadio del PDAC non sia stata dimostrata (Ellenrieder et al., 2000; Yamamoto et al., 2001), l'espressione della MMP-2 nelle cellule tumorali può rivestire un importante ruolo per la progressione tumorale e, in particolare, per lo sviluppo di metastasi.

Anche la MMP-9 è una MMP con attività gelatinolitica. La sua espressione nel PDAC è fortemente correlata con il coinvolgimento dei linfonodi e la presenza di metastasi a distanza (Pryczynicz et al., 2007), suggerendo quindi per la MMP-9 un ruolo chiave nella progressione del PDAC. Inoltre, è stata riportata una correlazione fra espressione della MMP-9 nel PDAC e prognosi negativa della patologia (Pryczynicz et al., 2007). Dati in letteratura hanno dimostrato che la MMP-2 viene secreta prevalentemente dallo stroma del PDAC, mentre la MMP-9 è espressa allo stesso modo sia nelle cellule di carcinoma sia nelle cellule stromali (Pryczynicz et al., 2007). I risultati di questo studio hanno evidenziato elevati livelli ed attività di MMP-2 e MMP-9 in tutte le linee cellulari considerate. In particolare, maggiori livelli di MMP-2 sono stati riscontrati nelle HPAF-II e HPAC, rispetto alle PL45.

I dati finora esposti mostrano quindi un quadro abbastanza contraddittorio relativamente al fenotipo delle cellule di PDAC considerate; esse, infatti, sono caratterizzate dall'espressione di caratteristiche tipiche di un fenotipo epiteliale ben differenziato, contestualmente all'espressione di caratteristiche peculiari di cellule caratterizzate dalla spiccata capacità di invasione.

Per poter meglio caratterizzare il fenotipo delle cellule HPAF-II, HPAC e PL45 è stata valutata l'espressione proteica delle tre linee di PDAC. A tale scopo è stata effettuata un'analisi proteomica di tipo differenziale, sfruttando la separazione elettroforetica bidimensionale e la successiva identificazione proteica mediante spettrometria di massa. Mediante analisi proteomica degli estratti abbiamo potuto valutare le differenze di espressione proteica tra le tre linee cellulari di adenocarcinoma duttale del pancreas a nostra disposizione. Tali differenze potrebbero verosimilmente ripercuotersi sul comportamento di tali cellule in coltura, sulla loro

morfologia e, non ultimo, sulla loro suscettibilità a diversi trattamenti. Di particolare interesse tra le proteine identificate sono quelle coinvolte nel rimodellamento cellulare/citoscheletrico, nella motilità cellulare e nella capacità di metastatizzare. Come visto in precedenza, le cellule di PDAC analizzate mantengono infatti diversi tratti caratteristici di un fenotipo epiteliale pur possedendo alcune caratteristiche di cellule mesenchimali, come gli elevati livelli di espressione di MMPs. Le analisi di espressione proteica hanno evidenziato che le cellule analizzate presentano un profilo di espressione proteica differente per quanto riguarda alcune proteine coinvolte in vie metaboliche o nella risposta a stress e molte proteine che svolgono ruoli chiave nel rimodellamento del citoscheletro e nella motilità cellulare.

Una proteina espressa ad elevati livelli in tutte le tre linee cellulari è, ad esempio, l'eizrina; questa proteina appartiene alla famiglia di proteine ERM (Ezrina-Radixina-Moesina) che svolgono il ruolo di connessione tra citoscheletro actinico e membrana cellulare. L'eizrina è inoltre implicata in numerose vie di trasduzione del segnale: può essere, ad esempio, fosforilata da Src, con cui coopera nella deregolazione dell'adesione cellulare, favorendo così la dispersione di cellule tumorali ([Heiska et al., 2011](#)) e da chinasi Rho dipendenti, durante processi di rimodellamento del citoscheletro actinico, nella formazione di filopodia e microvilli ([Nowak et al., 2010](#)). Elevati livelli di espressione sono associati al processo metastatico di diversi tumori, sia di origine epiteliale sia di origine non-epiteliale, come ad esempio astrocitomi, carcinomi epatocellulari e, tra gli altri, i carcinomi del pancreas ([Chen et al., 2013](#)). I nostri risultati mostrano che tutte le tre linee cellulari esprimono elevati livelli di eizrina, ma una delle isoforme, probabilmente una forma fosforilata, è significativamente più espressa nelle HPAC e nelle HPAF-II rispetto alle PL45 ($p < 0.01$). Questo dato è in accordo col riscontro di un fenotipo epiteliale maggiormente differenziato in queste cellule rispetto alle cellule PL45 che invece mostrano meno evidenti caratteristiche epiteliali. In letteratura ([Heiska et al., 2011](#)), la fosforilazione da parte di Src dell'eizrina svolge un ruolo chiave nella serie di processi "Src-dipendenti" alla base dei meccanismi di metastatizzazione. Saranno quindi necessari ulteriori esperimenti per comprendere le differenze di espressione osservate, dal momento che tutte le tre linee cellulari analizzate sono caratterizzate da elevato potenziale invasivo, come evidenziato dall'analisi degli zimogrammi. Nell'approfondire il ruolo della eizrina e della sua fosforilazione bisognerà tenere conto dell'evidenza sperimentale che ha dimostrato un diverso pattern di espressione a seconda del tipo di coltura utilizzata ([Heiska et al., 2011](#)): in colture in monostrato, infatti, una mutazione nel sito di fosforilazione dell'eizrina ha mostrato effetti completamente diversi rispetto alle colture 3D, che permettono di mantenere l'architettura tridimensionale dei tessuti in vivo.

Un'altra proteina, la cui attività si sovrappone in parte a quella dell'eizrina, fortemente coinvolta nel rimodellamento del citoscheletro actinico e che risulta espressa in maniera differenziale

nelle tre linee cellulari di PDAC, è la cofilina-1. Questa proteina è in grado di influenzare la velocità di dissociazione delle unità monomeriche di actina dall'estremità negativa, aumentando quindi il turnover dell'actina filamentosa, in particolare in prossimità della membrana plasmatica nelle aree coinvolte nel movimento cellulare (Nowak et al., 2010). Anche in questo caso l'attività di questa proteina è regolata, negativamente (Nowak et al., 2010), da reazioni di fosforilazione. Elevati livelli di cofilina si correlano alla capacità migratoria di cellule di diverse specie tumorali (Nowak et al., 2010). I dati di questo studio mostrano che la cofilina-1 è maggiormente espressa nelle cellule HPAF-II e HPAC, rispetto alle cellule PL45 ($p < 0.05$), suggerendo quindi una loro capacità invasiva più spiccata, in accordo con l'espressione della ezrina e con l'analisi zimografica.

Considerato il ruolo di cofilina ed ezrina e vista la loro fine regolazione all'interno della cellula, i dati relativi alla loro espressione dovranno essere ulteriormente analizzati per poter delineare i possibili meccanismi coinvolti. Sarà infatti necessario investigare i livelli e i tipi di fosforilazione delle due proteine, possibilmente anche in colture cellulari 3D, oltre a definirne la precisa localizzazione cellulare. Entrambe le proteine possono infatti localizzarsi in modo diverso all'interno della cellula (Nowak et al., 2010, Jin et al., 2012), anche in base al loro stato di fosforilazione, quindi, aella loro attività.

La cheratina 8, in tre diverse isoforme, è risultata essere down-regolata nelle cellule HPAC ($p < 0.01$) e HPAF- II ($p < 0.01$) rispetto alle PL45, a conferma dell'ipotesi che le PL45 siano caratterizzate da un fenotipo maggiormente mesenchimale rispetto alle HPAF-II e alle HPAC. In accordo con la letteratura (Fortier et al., 2013), bassi livelli di cheratina 8 in cellule tumorali si correlano con elevata capacità invasiva, senza tuttavia alterare l'espressione di molti marcatori di EMT, tra cui la E-caderina e senza mostrare evidenti differenze a livello del citoscheletro actinico. Quest'ultima caratteristica suggerisce un coinvoglimento dei filamenti intermedi di cheratina 8 del citoscheletro nella biologia del PDAC.

Se consideriamo complessivamente i marcatori di EMT analizzati nelle cellule di PDAC, e in particolare il complesso E-caderina/ β -catenina e la vimentina, il pattern di espressione sembra in apparente contraddizione con i classici meccanismi di EMT. Infatti, le cellule di PDAC considerate mantengono le caratteristiche tipiche del fenotipo epiteliale ben differenziato, sebbene allo stesso tempo esprimano alti livelli di MMPs e di altre proteine potenzialmente coinvolte nel rimodellamento del citoscheletro e in processi associati alla migrazione cellulare e metastatizzazione.

Se consideriamo che la perdita di E-caderina viene descritta come evento fondamentale durante la EMT nella carcinogenesi, un numero considerevole di linee cellulari di PDAC dovrebbe presentare diminuzione o perdita della E-caderina, diversamente da quanto

evidenziato dai nostri risultati. Dati in letteratura supportano, tuttavia, i nostri risultati dimostrando che 6 linee cellulari di PDAC su 7 mantengono l'espressione della E-caderina a livello della membrana cellulare e che l'espressione dei marcatori mesenchimali di EMT è simile a quella osservata nelle cellule normali di dotto pancreatico (Cates et al., 2009). In questo complesso scenario possiamo formulare alcune ipotesi al fine di spiegare questa apparente contraddizione tra mantenimento del fenotipo epiteliale differenziato ed elevata malignità delle cellule di PDAC. Una prima considerazione possibile tiene conto di numerose evidenze sperimentali che indicano che molti carcinomi invasivi e metastatici non sono caratterizzati da una completa EMT o non presentano segni di EMT e sono costituiti da cellule con caratteristiche morfologiche e molecolari compatibili con un fenotipo epiteliale differenziato, inclusi elevati livelli di E-caderina, come osservato nel nostro studio, nonché presenza di giunzioni cellulari e polarità cellulare (Christiansen e Rajasekaran, 2006). Cellule di carcinoma con questo fenotipo sono state descritte nel tumore della prostata (Christiansen et al., 2005) e della mammella (Tan et al., 1999; Ng, 2002). Inoltre, la E-caderina può continuare a formare un complesso con le catenine anche in carcinomi metastatici (Kartenbeck et al., 2005). In base a quanto esposto, la correlazione inversa generalmente descritta tra espressione della E-caderina e potenziale invasivo del carcinoma non è da considerare come un criterio assoluto. Un ulteriore aspetto da considerare in questo contesto è che il processo di EMT può essere incompleto, suggerendo pertanto che la transizione che porta all'acquisizione di un fenotipo maligno non è un evento "tutto o nulla", ma piuttosto un processo multistep che può presentare un ampio intervallo di modificazioni fenotipiche. Inoltre, i diversi steps in cui si sviluppa il processo di EMT non necessariamente avvengono consecutivamente e non necessariamente sono rilevabili durante la EMT (Christiansen e Rajasekaran, 2006). Queste due situazioni sono supportate dal riscontro che la completa EMT è raramente osservata in biopsie ottenute da pazienti affetti da PDAC (Wicki et al., 2006) e che in tali biopsie la perdita dell'espressione di E-caderina a livello della membrana plasmatica è descritta in un numero di campioni pari solo al 30% - 50% dei casi. Un pattern simile è stato osservato per la β -catenina (Pignatelli et al., 1994; Li e Ji, 2003; Pryczynicz et al., 2007).

Un aspetto importante da tenere in considerazione sono le diverse modalità che le cellule di carcinoma possono adottare per invadere i tessuti circostanti. Cellule di carcinoma isolate e con un fenotipo riconducibile ad una EMT completa sono altamente mobili e invadono l'ambiente circostante sotto forma di singole cellule simil-mesenchimali. Nel caso, invece, di cellule di carcinoma che adottano una modalità di invasione collettiva, il fenotipo di tali cellule si presenta diverso. In questo caso, infatti, le cellule invadono i tessuti circostanti sotto forma di aggregati multicellulari che contengono cellule differenziate, che mantengono le caratteristiche del fenotipo epiteliale e che rimangono pertanto coese. Tali cellule mantengono

quindi le giunzioni intercellulari e migrano sotto forma di lamine, tubuli o aggregati mediante l'emissione di protrusioni citoplasmatiche quali gli pseudopodi e gli invadopodi, dove il rilascio di MMPs permette la digestione proteolitica della matrice extracellulare nell'ambiente circostante il tumore (Yilmaz e Christofori, 2010). Un numero significativo di carcinomi, inclusi il carcinoma della mammella e della prostata, il tumore a grosse cellule del polmone e il carcinoma ovarico, è classificato in base alle caratteristiche patologiche come invasivo e maligno pur non perdendo l'espressione della E-caderina: tali tumori utilizzano una modalità di migrazione e invasività collettiva (Wicki et al., 2006; Yilmaz e Christofori, 2010). In base a quanto esposto, la modalità di migrazione collettiva e una incompleta EMT consentono alle cellule tumorali di essere altamente invasive, similmente alle cellule caratterizzate da un fenotipo chiaramente mesenchimale, pur mantenendo l'espressione di E-caderina e l'integrità delle giunzioni aderenti. Inoltre, cellule a migrazione collettiva esprimono MMPs come la MMP-2 per rimodellare la matrice extracellulare (Yilmaz et al., 2007), similmente a quanto abbiamo osservato anche nelle cellule altamente invasive HPAF-II, HPAC e PL45. Ulteriori dati che possono avvalorare l'ipotesi della migrazione collettiva sono quelli emersi dall'analisi proteomica. Questa ha evidenziato come le tre linee cellulari siano in realtà in grado di esprimere diverse proteine coinvolte nel rimodellamento del citoscheletro actinico, in particolare nel movimento cellulare, come ad esempio ezrina e cofilina. Inoltre, in due delle tre linee cellulari (HPAC e HPAF II), si osserva la down-regolazione della cheratina 8; tale evento, secondo letteratura, si può accompagnare a processi di migrazione collettiva.

EFFETTO DELL'ORGANIZZAZIONE 3D SUL FENOTIPO DELLE CELLULE DI PDAC

Al fine di meglio comprendere il fenotipo delle cellule di PDAC e, in particolare, il ruolo della EMT, nella seconda parte del lavoro abbiamo voluto valutare se l'arrangiamento tridimensionale potesse influire sull'espressione di diversi marcatori di EMT analizzati nelle cellule coltivate in monostrato.

Dopo aver messo a punto le condizioni di coltura 3D, le valutazioni morfologiche e molecolari sono state effettuate in cellule HPAC mediante immunofluorescenza, real-time pcr e western blot, al fine di confrontare l'espressione dei marcatori di EMT in cellule coltivate in sferoidi 3D o in monostrato.

L'analisi al microscopio confocale ha permesso di confermare l'espressione del complesso E-caderina/ β -catenina a livello della membrana plasmatica in cellule coltivate in monostrato. Tale espressione era similmente evidente anche nelle cellule coltivate in sferoidi 3D, suggerendo la presenza di giunzioni aderenti funzionali in entrambe le condizioni sperimentali. A supporto del

fenotipo epiteliale, l'actina è risultata localizzata nel citoplasma corticale delle cellule HPAC coltivate in sferoidi 3D.

Tuttavia, in queste nuove condizioni di coltura 3D, le cellule di PDAC sono risultate in grado di esprimere anche la N-caderina. Negli sferoidi da noi analizzati, infatti, abbiamo osservato non solo l'espressione del complesso E-caderina/ β -catenina a livello della membrana plasmatica, ma anche l'espressione della N-caderina in prossimità delle membrane cellulari. Tale evidenza sperimentale suggerisce che le cellule HPAC poste in condizioni di coltura 3D siano in grado almeno in parte di andare in contro allo "switch" delle caderine tipico dei processi di EMT. L'espressione concomitante delle due caderine potrebbe configurarsi come un possibile rafforzamento delle giunzioni cellulari e della coesività.

Oltre a questi marcatori di fenotipo epiteliale sono stati analizzati alcuni marcatori del fenotipo mesenchimale: l'espressione di un marcatore mesenchimale come l' α SMA è risultata simile nelle cellule coltivate in monostrato e in sferoidi 3D, supportando quindi l'ipotesi che le cellule HPAC vadano incontro ad EMT. I livelli di espressione di alcuni marcatori di EMT, come Snail, Slug e Zeb1, non hanno mostrato differenze significative, sebbene Snail e Slug tendano a diminuire quando le cellule sono coltivate in 3D. Questo dato è in parziale accordo con quanto osservato in letteratura, in cui è riportata una diminuzione di espressione di questi due geni in tessuti tumorali rispetto ai corrispettivi tessuti benigni ([Cates et al., 2009](#)).

Contrariamente a quanto osservato per i geni sopra descritti, l'effetto delle colture 3D è molto marcato quando si valuta l'espressione del COL- I. Questa proteina, tipicamente espressa da cellule di tipo mesenchimale, è risultata espressa solo in alcune cellule HPAC coltivate in monostrato. Diversamente, l'espressione del COL-I è risultata up regolata nelle cellule coltivate in sferoidi 3D.

L'espressione genica della E-caderina è risultata non significativamente modificata nelle due condizioni sperimentali, ma mediante analisi western blot è stato possibile individuare alcune differenze di espressione proteica della E-caderina. Abbiamo infatti potuto osservare come le cellule HPAC, coltivate come sferoidi 3D, fossero caratterizzate da una maggior espressione della forma completa della E-caderina, rispetto alle cellule coltivate in monostrato. Nei lisati cellulari di queste ultime sono stati invece rilevati diversi frammenti di taglio della E-caderina, lasciando supporre quindi una certa instabilità delle giunzioni aderenti nelle cellule cresciute su monostrato. Questo dato potrebbe quindi rafforzare l'ipotesi di una maggior stabilità e resistenza delle giunzioni aderenti quando le cellule sono coltivate in colture 3D, a supporto dell'ipotesi di un meccanismo di invasività collettiva per le cellule di PDAC ([Yilmaz e Christofori, 2010](#)).

L'ipotesi che le PDAC invadano con un meccanismo di migrazione collettiva è supportata anche dall'osservazione che nei modelli 3D precedentemente descritti in letteratura non sono

mai state osservate cellule in grado di invadere lo spazio circostante singolarmente ([Bronsert et al., 2014](#)). Inoltre, un aumento dell'espressione della E-caderina è stata osservata al fronte di migrazione di cellule epiteliali che si muovevano sotto forma di lamine ([Hwang et al., 2012](#)). Un sistema giunzionale integro e funzionale si configura quale caratteristica fondamentale per i meccanismi di migrazione collettiva, in quanto garantisce coesione durante la migrazione e una maggiore efficienza nella diffusione di messaggeri paracrini e quindi nella coordinazione ([Friedl e Wolf, 2010](#)).

La podoplanina è una piccola proteina “mucin-like” che risulta over-espressa in una serie di tumori, tra cui il carcinoma squamoso del cavo orale, tumori al polmone e alla pelle e il mesotelioma, suggerendone un ruolo nella progressione tumorale ([Kato et al., 2005](#), [Schact et al., 2005](#), [Kimura e Kimura, 2005](#), [Martin-villar et al., 2005](#), [Wicki et al., 2006](#)). Il reale contributo di questa proteina alla progressione tumorale non è stato ancora definito, ma si ipotizza un suo ruolo nella formazione di filopodi e quindi nella migrazione e invasione cellulare, in particolar modo nel caso di migrazione collettiva ([Wicki et al., 2006](#)). Il riscontro dell'espressione della podoplanina nelle cellule HPAC coltivate sia in monostrato che in colture 3D sarebbe quindi coerente con quanto presente in letteratura.

Considerati nel loro insieme, i risultati di questo studio rivelano importanti differenze nel fenotipo delle cellule di HPAC coltivate in monostrato o in sferoidi 3D, e forniscono ulteriore evidenza che le cellule HPAC esprimono marcatori di EMT.

Infatti, le cellule coltivate in 3D sono caratterizzate dalla presenza di giunzioni aderenti funzionali e dalla concomitante espressione di marcatori di fenotipo mesenchimale, quali N-caderina e COL-I, che sono invece non osservabili nelle cellule coltivate in monostrato.

Il mantenimento del complesso E-caderina/ β -catenina ai confine fra cellule adiacenti supporta l'ipotesi di una migrazione collettiva, in accordo con l'espressione della podoplanina.

Le informazioni complessive derivanti dalla seconda parte del nostro studio suggeriscono l'importanza, nel campo della ricerca biomedica, della necessità di selezionare, oltre a un modello cellulare adeguato, anche le appropriate condizioni di coltura. In particolare, l'approccio delle colture 3D può colmare le lacune sperimentali lasciate aperte dai semplici modelli in monostrato, avvicinando le condizioni sperimentali analizzate alle reali condizioni a cui le cellule sono soggette *in vivo*. Tali condizioni permetteranno anche di individuare modelli sperimentali preclinici utili per caratterizzare specifici meccanismi cellulari coinvolti nella progressione del PDAC e per valutare gli effetti di possibili strategie terapeutiche.

BIBLIOGRAFIA

- Ayollo DV, Zhitnyak IY, Vasiliev JM, Gloushankova NA. *Rearrangements of the actin cytoskeleton and E-cadherin-based adherens junctions caused by neoplastic transformation change cell-cell interactions*. PLoS One, 2009. 4: e8027.
- Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, De Carlo A, Engler JA. *Matrix metalloproteinases: a review*. Crit. Rev. Oral Biol. Med., 1993. 4: 197-250.
- Bronsart P, Enderle-Ammour K, Bader M, Timme S, Kuehs M, Csanadi A, Kayser G, Kohler I, Bausch D, Hoepfner J, Hopt U, Keck T, Stickeler E, Passlick B, Schilling O, Reiss C, Vashist Y, Brabletz T, Berger J, Lotz J, Olesch J, Werner M, Wellner U. *Cancer cell invasion and EMT marker expression - a three-dimensional study of the human cancer-host interface*. J. Pathol., 2014. 234: 410-422.
- Burk U, Schubert J, Wellner U, Schmalhofer O, Vincan E, Spaderna S, Brabletz T. *A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells*. EMBO Rep., 2008. 9: 582–589.
- Cano C, Motoo Y, Iovanna JL. *Epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic adenocarcinoma*. ScientificWorldJournal, 2010. 10: 1947–1957.
- Cao J, Rehemtulla A, Bahou W, Zucker S. *Membrane type matrix metalloproteinase 1 activates pro-gelatinase A without furin cleavage of the N-terminal domain*. J. Biol. Chem., 1996. 271: 30174-30180.
- Cates JM, Byrd RH, Fohn LE, Tatsas AD, Washington MK, Black CC. *Epithelial-mesenchymal transition markers in pancreatic ductal adenocarcinoma*. Pancreas, 2009. 38: e1-6.
- Chen QY, Xu W, Jiao DM, Wu LJ, Song J, Yan J, Shi JG. *Silence of ezrin modifies migration and actin cytoskeleton rearrangements and enhances chemosensitivity of lung cancer cells in vitro*. Mol. Cell Biochem., 2013. 377:207-218.
- Christiansen JJ, Rajasekaran AK. *Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis*. Cancer Res., 2006. 66: 8319-8326.

- Christiansen JJ, Rajasekaran SA, Inge L, Cheng L, Anilkumar G, Bander NH, Rajasekaran AK. *N-glycosylation and microtubule integrity are involved in apical targeting of prostate-specific membrane antigen: implications for immunotherapy*. Mol. Cancer Ther., 2005. 4: 704-714.
- Collier IE, Wilhelm SM, Eisen AZ, Marmer BL, Grant GA, Seltzer JL, Kronberger A, He CS, Bauer EA, Goldberg GI. *H-ras oncogene transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloproteinase capable of degrading basement membrane collagen*. J. Biol. Chem., 1988. 263: 6579-6587.
- Corcoran ML, Stetler-Stevenson WG. *Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 stimulates fibroblast proliferation via a cAMP-dependent mechanism*. J. Biol. Chem., 1995. 270: 13453-13459.
- David MJ, Rajasekaran AK. *Dishonorable discharge: the oncogenic roles of cleaved E-cadherin fragments*. Cancer res., 2012. 72: 1-7.
- El-Bahrawy, M. Pignatelli. *E-cadherin and catenins: molecules with versatile roles in normal and neoplastic epithelial cell biology*. Microsc. Res. Tech., 1998. 43: 224-232.
- Ellenrieder V, Alber B, Lacher U, Hendler SF, Menke A, Boeck W, Wagner M, Wilda M, Friess H, Buchler M, Adler G, Gress TM. *Role of MT-MMPs and MMP-2 in pancreatic cancer progression*. Int. J. Cancer, 2000. 85: 14-20.
- Ferber EC, Kajita M, Wadlow A, Tobiansky L, Niessen C, Ariga H, Daniel J, Fujita Y. *A role for the cleaved cytoplasmic domain of E-cadherin in the nucleus*. J. Biol. Chem., 2008. 283: 12691-12700.
- Fortier AM, Asselin E, Cadrin M. *Keratin 8 and 18 loss in epithelial cancer cells increases collective cell migration and cisplatin sensitivity through claudin1 up-regulation*. J. Biol. Chem., 2013. 288: 11555-11571.
- Fridman R, Giaccone G, Kanemoto T, Martin GR, Gazdar AF, Mulshine JL. *Reconstituted basement membrane (matrigel) and laminin can enhance the tumorigenicity and the drug resistance of small cell lung cancer cell lines*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 1990. 87: 698-702.
- Friedl P. *Prespecification and Plasticity: shifting mechanisms of cell migration*. Curr. Opin. Cell Biol., 2004. 16: 14-23.

- Friedl P, Wolf K. *Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model*. J. Cell Biol., 2010. 188: 11-19.
- Friess H, Yamanaka Y, Buchler M, Ebert M, Beger HG, Gold LI, Korc M. *Enhanced expression of transforming growth factor beta isoforms in pancreatic cancer correlates with decreased survival*. Gastroenterology, 1993. 105: 1846–1856.
- Ghaneh P, Costello E, Neoptolemos JP. *Biology and management of pancreatic cancer*. Gut, 2007. 56: 1134-1152.
- Ghosh S, Spagnoli GC, Martin I, Ploegert S, Demougin P, Heberer M, Reschner A. *Three-dimensional culture of melanoma cells profoundly affects gene expression profile: a high density oligonucleotide array study*. J. Cell Physiol., 2005. 204: 522-531.
- Gordon KJ, Dong M, Chislock EM, Fields TA, Blobe GC. *Loss of type III transforming growth factor beta receptor expression increases motility and invasiveness associated with epithelial to mesenchymal transition during pancreatic cancer progression*. Carcinogenesis, 2008. 29: 252–262.
- Halbleib JM, Nelson WJ. *Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis*. Genes Dev., 2006. 20: 3199–3214.
- Harris ED Jr, Welgus HG, Krane SM. *Regulation of the mammalian collagenases*. Coll. Relat. Res., 1984. 4: 493-512.
- Hartsock A, Nelson WJ. *Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton*. Biochim. Biophys. Acta, 2008. 1778: 660-669.
- Hay ED. *Cell biology of extracellular matrix*. (Second edition); New York, 1991.
- Heiska L, Melikova M, Zhao F, Saotome I, McClatchey AI, Carpén O. *Ezrin is key regulator of Src-induced malignant phenotype in three-dimensional environment*. Oncogene, 2011. 30: 4953-4962.
- Hirohashi S. *Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers*. Am. J. Pathol., 1998. 153: 333-339.
- Hotz B, Arndt M, Dullat S, Bhargava S, Buhr HJ, Hotz HG. *Epithelial to mesenchymal transition: expression of the regulators snail, slug, and twist in pancreatic cancer*. Clin. Cancer Res., 2007. 13: 4769-4776.

- Huber MA, Kraut N, Beug H. *Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression*. Curr. Opin. in Cell Biol., 2005. 17: 548-558.
- Hwang S, Zimmerman NP, Agle KA, Turner JR, Kumar SN, Dwinell MB. *E-cadherin is critical for collective sheet migration and is regulated by the chemokine CXCL12 protein during restitution*. J. Biol. Chem., 2012. 287: 22227-22240.
- Itoh Y, Takamura A, Ito N, Maru Y, Sato H, Suenaga N, Aoki T, Seiki M. *Homophilic complex formation of MT1-MMP facilitates proMMP-2 activation on the cell surface and promotes tumor cell invasion*. EMBO J, 2001. 20: 4782-4793.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. *Cancer statistics, 2009*. CA Cancer J. Clin., 2009. 59: 225-249.
- Jin J, Jin T, Quan M, Piao Y, Lin Z. *Ezrin overexpression predicts the poor prognosis of gastric adenocarcinoma*. Diagn. Pathol., 2012. 7: 135.
- Joo YE, Rew JS, Park CS, Kim SJ. *Expression of E-cadherin, alpha and beta-catenins in patients with pancreatic adenocarcinoma*. Pancreatology, 2002. 2: 129-137.
- Kalluri R, Weinberg RA. *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. J. Clin. Invest., 2009. 119: 1420-1428.
- Kang Y, Massagué J. *Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis*. Cell, 2004. 118: 277-279.
- Kartenbeck J, Haselmann U, Gassler N. *Synthesis of junctional proteins in metastasizing colon cancer cells*. Eur. J. Cell. Biol., 2005. 84: 417-430.
- Kato Y, Kaneko M, Sata M, Fujita N, Tsuruo T, Osawa M. *Enhanced expression of Aggrus (T1alpha/podoplanin), a platelet-aggregation-inducing factor in lung squamous cell carcinoma*. Tumour Biol., 2005. 26: 195-200.
- Kimura N, Kimura I. *Podoplanin as a marker for mesothelioma*. Pathol. Int., 2005. 55: 83-86.
- Kishi S, Takeyama Y, Ueda T, Yasuda T, Shinzeki M, Kuroda Y, Yokozaki H. *Pancreatic duct obstruction itself induces expression of α Smooth muscle Actin in pancreatic stellate cells*. J. Surg. Res., 2003. 114: 6-14.

- Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. *Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases*. Anal. Biochem., 1994. 218: 325-329.
- Krantz SB, Shields MA, Dangi-Garimella S, Bentrem DJ, Munshi HG. *Contribution of Epithelial-Mesenchymal Transition to Pancreatic Cancer Progression*. Cancer, 2010. 2: 2084-2097.
- Lagamba D, Nawshad A, Hay ED. *Microarray analysis of gene expression during epithelial-mesenchymal transformation*. Dev. Dyn., 2005. 234: 132–142.
- Lamouille S, Xu J, Derynck R. *Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition*. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., 2014. 15: 178-196.
- Lang SH, Hyde C, Reid IN, Hitchcock IS, Hart CA, Bryden AA, Villette JM, Stower MJ, Maitland NJ. *Enhanced expression of vimentin in motile prostate cell lines and in poorly differentiated and metastatic prostate carcinoma*. Prostate, 2002. 52: 253-263.
- Le Clainche C, Carlier MF. *Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration*. Physiol. Rev., 2008. 88: 489-513.
- Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW. *The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease*. J. Cell. Biol., 2006. 172: 973-981.
- Li D, Xie K, Wolff R, Abbruzzese JL. *Pancreatic cancer*. Lancet, 2004. 363: 1049-1057.
- Li YJ, Ji XR. *Relationship between expression of E-cadherin-catenin complex and clinicopathologic characteristics of pancreatic cancer*. World J. Gastroenterol., 2003. 9: 368-372.
- Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. *Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation*. Cancer Res., 1991. 51: 5054-5059.
- Marambaud P, Shioi J, Serban G, Georgakopoulos A, Sarner S, Nagy V, Baki L, Wen P, Efthimiopoulos S, Shao Z, Wisniewski T, Robakis NK. *A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions*. EMBO J., 2002. 21: 1948-1956.
- Martín-Villar E, Scholl FG, Gamallo C, Yurrita MM, Muñoz-Guerra M, Cruces J, Quintanilla M. *Characterization of human PA2.26 antigen (T1alpha-2, podoplanin), a small membrane mucin induced in oral squamous cell carcinomas*. Int. J. Cancer, 2005. 113: 899-910.

- Mendez MG, Kojima S, Goldman RD. *Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition*. FASEB J., 2010. 24: 1838-51.
- Nagase H, Woessner JF Jr. *Matrix metalloproteinases*. J. Biol. Chem., 1999. 274: 21491-21494.
- Nakajima S, Doi R, Toyoda E, Tsuji S, Wada M, Koizumi M, Tulachan SS, Ito D, Kami K, Mori T, Kawaguchi Y, Fujimoto K, Hosotani R, Imamura M. *N-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transition in pancreatic carcinoma*. Clin. Cancer Res., 2004. 10: 4125-4133.
- Nelson WJ, Nusse R. *Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways*. Science, 2004. 303: 1483–1487.
- Nelson WJ. *Regulation of cell-cell adhesion by the cadherin-catenin complex*. Biochem. Soc. Trans., 2008. 36: 149-155.
- Ng WK. *Fine-needle aspiration cytology findings of an uncommon micropapillary variant of pure mucinous carcinoma of the breast: review of patients over an 8-year period*. Cancer, 2002. 96: 280-288.
- Nowak D, Mazur AJ, Popow-Woźniak A, Radwańska A, Mannherz HG, Malicka-Błaszkiwicz M. *Subcellular distribution and expression of cofilin and ezrin in human colon adenocarcinoma cell lines with different metastatic potential*. Eur. J. Histochem., 2010. 54: e14.
- Ooi LP, Crawford DH, Gotley DC, Clouston AD, Strong RW, Gobe GC, Halliday JW, Bridle KR, Ramm GA. *Evidence that “myofibroblast-like” cells are the cellular source of capsular collagen in hepatocellular carcinoma*. J. Hepatol., 1997. 26: 798-807.
- Olson MF, Sahai E. *The actin cytoskeleton in cancer cell motility*. Clin. Exp. Metastasis, 2009. 26: 273-287.
- Pandol S, Edderkaoui M, Gukovsky I, Lugea A, Gukovskaya A. *Desmoplasia of pancreatic ductal adenocarcinoma*. Clin. Gastroenterol. Hepatol., 2009. 7: 44-47.
- Pawlak G, Helfman DM. *Cytoskeletal changes in cell transformation and tumorigenesis*. Curr. Opin. Genet. Dev., 2001. 11: 41–47.
- Pei D, Weiss SJ. *Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen*. Nature, 1995. 375: 244-247.

- Peinado H, Portillo F, Cano A. *Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis*. Int. J. Dev. Biol., 2004. 48: 365–375.
- Pignatelli M, Ansari TW, Gunter P, Liu D, Hirano S, Takeichi M, Klöppel G, Lemoine NR. *Loss of membranous E-cadherin expression in pancreatic cancer: correlation with lymph node metastasis, high grade, and advanced stage*. J. Pathol., 1994. 174: 243-248.
- Pollard TD, Borisy GG. *Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments*. Cell, 2003. 112: 453–465..
- Potentia S, Zeisberg E, Kalluri R. *The role of endothelial-to-mesenchymal transition in cancer progression*. Br. J. Cancer, 2008. 99: 1375–1379.
- Pryczynicz A, Guzinska-Ustymowicz K, Dymicka-Piekarska V, Czyzewska J, Kemona A. *Expression of matrix metalloproteinase 9 in pancreatic ductal carcinoma is associated with tumor metastasis formation*. Folia Histochem. Cytobiol., 2007. 45: 37-40.
- Rooprai HK, McCormick D. *Proteases and their inhibitors in human brain tumours: a review*. Anticancer Res., 1997. 17: 4151-4162.
- Savagner P. *Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition*. Bioessays, 2001. 23: 912-923.
- Schacht V, Dadras SS, Johnson LA, Jackson DG, Hong YK, Detmar M. *Up-regulation of the lymphatic marker podoplanin, a mucin-type transmembrane glycoprotein, in human squamous cell carcinomas and germ cell tumors*. Am. J. Pathol., 2005. 166: 913-921.
- Semb H, Christofori G. *The tumor-suppressor function of E-cadherin*. Am. J. Hum. Genet., 1998. 63: 1588-1593.
- Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI. *Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease*. J. Biol. Chem., 1995. 270: 5331-5338.
- Strongin AY, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI. *Plasma membrane-dependent activation of the 72-kDa type IV collagenase is prevented by complex formation with TIMP-2*. J. Biol. Chem., 1993. 268: 14033-14039.

Strutz F, Zeisberg M, Ziyadeh FN, Yang CQ, Kalluri R, Müller GA, Neilson EG. *Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation*. Kidney Int., 2002. 61: 1714–1728.

Thiery JP. *Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression*. Nat. Rev. Cancer, 2002. 2: 442-454.

Tan DS, Potts HW, Leong AC, Gillett CE, Skilton D, Harris WH, Liebmann RD, Hanby AM. *The biological and prognostic significance of cell polarity and E-cadherin in grade I infiltrating ductal carcinoma of the breast*. J. Pathol., 1999. 189: 20-27.

Thiery JP. *Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies*. Curr. Opin. Cell Biol., 2003. 15: 740–746.

Thiery JP, Sleeman JP. *Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions*. Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2006. 7: 131-142.

Tysnes BB, Mahesparan R. *Biological mechanisms of glioma invasion and potential therapeutic targets*. J. Neurooncol., 2001. 53: 129-147.

Van der Gaag NA, Rauws EA, Van Eijck CH, Bruno MJ, van der Harst E, Kubben FJ, Gerritsen JJ, Greve JW, Gerhards MF, de Hingh IH, Klinkenbijl JH, Nio CY, de Castro SM, Busch OR, van Gulik TM, Bossuyt PM, Gouma DJ. *Preoperative biliary drainage for cancer of the head of the pancreas*. N. Engl. J. Med., 2010. 362: 129–137.

Van Es JH, Barker N, Clevers H. *You WNT some, you lose some: oncogenes in the WNT signaling pathway*. Curr. Opin. Genet. Dev., 2003. 13: 28-33.

Van Meter TE, Rooprai HK, Kibble MM, Fillmore HL, Broaddus WC, Pilkington GJ. *The role of matrix metalloproteinase genes in glioma invasion: co-dependent and interactive proteolysis*. J. Neurooncol., 2001. 53: 213-235.

Vicovac L, Aplin JD. *Epithelial-mesenchymal transition during trophoblast differentiation*. Acta Anat. (Basel), 1996. 156: 202–216.

Vignjevic D, Montagnac G. *Reorganisation of the dendritic actin network during cancer cell migration and invasion*. Semin. Cancer Biol., 2008. 18: 12-22.

Vince GH, Bouterfa H, Goldbrunner R, Roosen K, Tonn JC. *Fast blue, a fluorescent tracer in glioma cell culture, affects cell proliferation and motility*. Neurosci Lett, 1997. 233: 148-150.

- Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M. *Pancreatic cancer*. Lancet, 2011. 378: 607-620.
- Visse R, Nagase H. *Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry*. Circ. Res., 2003. 92: 827-839.
- Vleminckx K, Vakaet Jr L, Mareel M, Fiers W, Van Roy F. *Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role*. Cell, 1991. 66: 107-109.
- Wheelock MJ, Johnson KR. *Cadherins as modulators of cellular phenotype*. Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 2003. 19: 207-235.
- Wicki A, Lehembre F, Wick N, Hantusch B, Kerjaschki D, Christofori G. *Tumor invasion in the absence of epithelial-mesenchymal transition: podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton*. Cancer Cell, 2006. 9: 261-72.
- Yamamoto H, Itoh F, Iku S, Adachi Y, Fukushima H, Sasaki S, Mukaiya M, Hirata K, Imai K. *Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human pancreatic adenocarcinomas: clinicopathologica and prognostic significance of matrilysin expression*. J. Clin. Oncol., 2001. 19: 1118-1127.
- Yamada S, Pokutta S, Drees F, Weis WI, Nelson WJ. *Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex*. Cell, 2005. 123: 889-901.
- Yilmaz M, Christofori G. *EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion*. Cancer Metastasis Rev., 2009. 28: 15-33.
- Yilmaz M, Christofori G, Lehembre F. *Distinct mechanisms of tumor invasion and metastasis*. Trends Mol. Med., 2007. 13: 535-541.
- Yong VW, Power C, Forsyth P, Edwards DR. *Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system*. Nat. Rev. Neurosci., 2001. 2: 502-511.
- Zavadil J, Bottinger EP. *TGF- β 1 and epithelial-to-mesenchymal transitions*. Oncogene, 2005. 24: 5764-5774.